

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr

und aus dem Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. E. Mitscherlich

Nachweis und Genetik eines Serumallotyps beim Rind

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

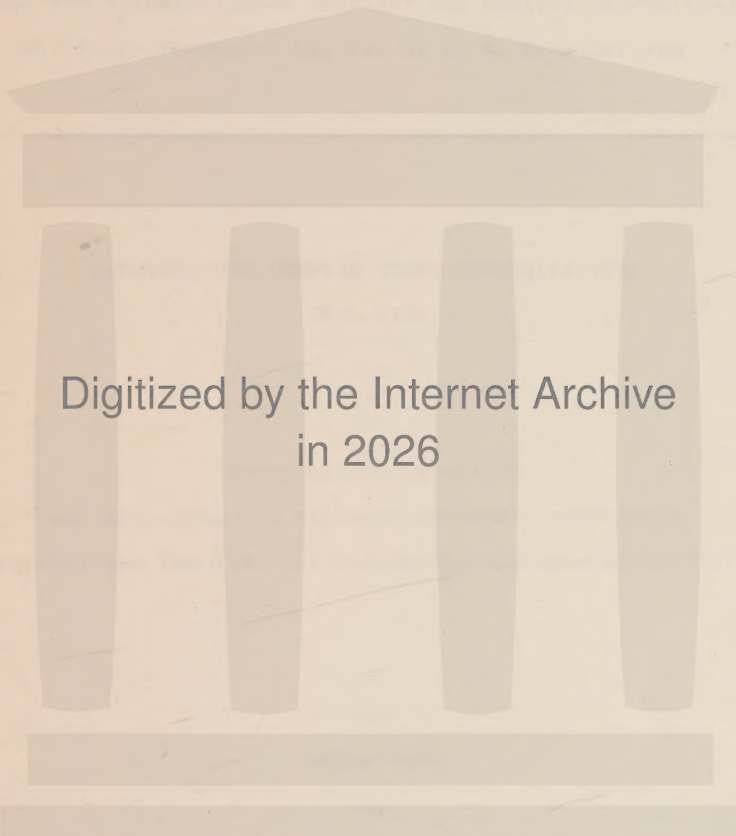
Peter Heeg

aus

München

München 1972

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556029_0012

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr

und aus dem Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen

Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. E. Mitscherlich

NACHWEIS UND GENETIK EINES SERUMALLOTYPS

BEIM RIND

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

PETER HEEG

aus

München

München 1972



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Professor Dr. E. Dahme
Referent: Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr
Korreferent: Professor Dr. I. Gylstorff

Tag der Promotion: 23. Februar 1973

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Arten und Entstehung genetischer Polymorphismen	3
2.2. Der Begriff der Allotypie	5
2.3. Allotypen bei Mensch und Tieren	8
2.3.1. Aufbau und Einteilung der Plasmalipoproteine	8
2.3.2. Aufbau und Einteilung der Immunglobuline	11
2.3.3. Übersicht über die Allotypen bei Mensch und Tieren	13
2.3.4. Die Allotypen des Rindes	22
2.3.5. Die Allotypen anderer landwirtschaftlicher Nutztiere	27
2.3.6. Allotypen und polygene Eigenschaften	31
3. Material und Methodik	35
3.1. Das Tiermaterial	35
3.2. Die Immunisierungsverfahren	37
3.2.1. Die Gewinnung der Anti-Rind-Seren vom Kaninchen	37
3.2.2. Die Gewinnung der Isoimmunseren vom Rind	38

	Seite
3.3. Methoden zum Nachweis und zur Beschreibung von Isoantigenen und Isoantikörpern	41
3.3.1. Der Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY	41
3.3.2. Die Immunelektrophorese	45
3.3.3. Die Immunelektroosmophorese	51
3.4. Der Nachweis von Proteinen, Lipoproteinen und Enzymen im Serum	54
3.4.1. Die horizontale Stärkegelelektrophorese	54
3.5. Die Isolierung von Lipoproteinen aus dem Serum	55
3.6. Statistische Methoden	56
4. Versuche und Ergebnisse	58
4.1. Methodische Arbeiten mit der Immunelektrophorese	58
4.2. Der Nachweis des Isoantigens	62
4.3. Die biochemische Beschreibung des Isoantigens	65
4.3.1. Physikochemische Eigenschaften	65
4.3.2. Immunelektrophoretische Untersuchungen	65
4.3.3. Immundiffusionsuntersuchungen mit isolierten Serumlipoproteinen	66
4.3.4. Untersuchungen an Gesamtspektren positiver und negativer Seren	68
4.3.5. Charakterisierung des Isopräzipitins	70

	Seite
4.4. Die genetische Auswertung der Verteilung des Allotyps im Tiermaterial	70
5. Besprechung der Ergebnisse	84
6. Zusammenfassung	90
7. Anhang 1: Bereitungsvorschriften für Pufferlösungen	94
8. Anhang 2: Färbemethoden	98
9. Literaturverzeichnis	102

1. Einleitung

Die Erforschung erblicher biochemischer Merkmale begann mit der Entdeckung der Blutgruppen durch LANDSTEINER (1901). Seither wurde eine Vielzahl biochemischer Merkmale gefunden, bei denen Moleküle mit gleichgerichteter Funktion Unterschiede in ihrem Aufbau und ihrer Menge aufwiesen (NEILANDS, 1952). Soweit dadurch unterschiedliche, diskontinuierlich verteilte Erscheinungsformen innerhalb einer Population bedingt werden, deren seltenster Merkmalstyp nicht allein durch Mutation erklärbar ist, bezeichnet man dies als genetischen Polymorphismus (FISHER, 1930; WRIGHT, 1931; FORD, 1945 u. 1966).

Der Nachweis von Genen, die einen Polymorphismus bedingen, bietet eine Anzahl von Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht und Veterinärmedizin (JOHANSSON et al., 1966). Gegenwärtig werden polymorphe Gensysteme beim Identitätsnachweis, bei der Abstammungskontrolle, der Zwillingsdiagnostik sowie der Schätzung von Homozygotie- bzw. Heterozygotiegraden benutzt. Mendelnde Gene sind außerdem ein wertvolles Hilfsmittel bei Rassen- und Evolutionsstudien. Darüber hinaus zeichnen sich

zukünftige Einsatzmöglichkeiten ab, wenn Beziehungen von monogenen Merkmalen zu Erbfehlern, physiologischen Leistungen oder zu Resistenz- und Immunitätsmechanismen gefunden werden (SPOONER, 1968). Da die ökonomisch wichtigen Leistungen der Haustiere im allgemeinen von vielen Genen bedingt werden, ist die Beurteilung durch ein einzelnes Merkmal nur sehr selten in nennenswertem Umfang möglich. Erst eine große Anzahl von Markierungsgenen, deren Lagen auf den Chromosomen ermittelt sind, erlauben weitergehende Rückschlüsse auf polygen bedingte Eigenschaften der Tiere (MC KUSICK, 1971).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, mit der Beschreibung eines Allotyps, eine für deutsche Rinderrassen neue Art monogener Merkmale darzustellen. Die damit verbundene Technik sollte so entwickelt werden, daß ein weiteres, routinemäßig brauchbares Verfahren zur Darstellung von Polymorphismen erreicht wird, ähnlich dem der Blutgruppenbestimmung oder der Protein- bzw. Enzymelektrophorese.

2. Literaturübersicht

2.1. Arten und Entstehung genetischer Polymorphismen

In allen untersuchten Mensch- und Tierpopulationen konnten genetische Polymorphismen gefunden werden. Eine polymorphe Verbreitung zeigen verschiedene Substanzen, wie z. B. die Blutgruppenantigene der Erythrozytenmembran und viele Proteine und Enzyme des Blutes und anderer Körperflüssigkeiten (BUSCHMANN und SCHMID, 1968; LATNER und SKILLEN, 1968; BACKHAUSZ, 1970; GRUBB, 1970). Polymorphe Verbindungen entstehen im Lauf der Evolution durch mutagene Einflüsse auf den genetischen Informationsträger, die Desoxyribonukleinsäure (DNS). Dadurch werden die Basen der DNS-Nukleotide verändert. Da die genetische Information durch die Reihenfolge dieser Basen gebildet wird, kann es vorkommen, daß bei der Biosynthese der Polypeptide eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht wird (WATSON, 1970). Diese Veränderung der Primärstruktur des Proteins kann für seine biologische Funktion ohne Bedeutung sein. Jedoch kann bereits die Veränderung einer einzigen Aminosäure in einem Protein für das betroffene Individuum nachteilige oder tödliche Folgen

haben, wie das bei der Sichelzellenanämie des Menschen der Fall ist. Seltener sind die Fälle, in denen Mutanten leistungsfähiger sind als ihre Ausgangsformen. So gibt es bei *Drosophila melanogaster* Mutanten, die bis zu 0,04 % Phenylthioharnstoff im Futter tolerieren (FORD, 1966).

Mutationen bedingen also Varianten unter den Lebewesen, von denen diejenigen Individuen ausgelesen werden können, die ihrer Umwelt am besten angepaßt sind. Außer durch Selektion kann die Häufigkeit eines Mutationsprodukts auch durch Mutation, durch Migration oder durch zufalls-gemäße Ausbreitung verändert werden (FALCONER, 1971). Dabei ist es möglich, daß mehrere Einflüsse zugleich wirken und zu Gleichgewichtslagen führen, die die für den Polymorphismus verantwortlichen Gene in bestimmten Frequenzen halten (LI, 1955). KIMURA und OHTA (1971 a u. b; OHTA und KIMURA, 1971) vertraten die Ansicht, daß die weitaus meisten Polymorphismen einen neutralen Selektionswert besitzen und durch Kräfte des Zufalls und der genetischen Drift in einer Population verbleiben. Demgegenüber war FORD (1966) der Auffassung, daß angesichts von spontanen Mutationsraten von 10^{-4} bis 10^{-7} nur solche Allele in einer Population verbleiben können, die

ihrem Träger einen selektiven Vorteil verleihen. Es ist denkbar, daß die Ursache für die genetisch bedingten Leistungsdifferenzen bei den Tieren in einer Vielzahl monogen bedingter Unterschiede in den molekularen Substanzen des Körpers, z. B. in den Enzymen, begründet ist (GELDERMANN, 1971 u. 1972 a). Da bei einer Reihe von Polymorphismen heterozygote Genotypen leistungsfähiger sind (BRILES, 1954; GILMOUR, 1960; ASHTON, 1972; FINCHAM, 1972; PIRCHNER et al., 1972), werden auch bei der züchterischen Selektion der Nutztiere Polymorphismen aufrechterhalten.

2.2. Der Begriff der Allotypie

Bereits im Jahre 1902 fand SCHÜTZE, daß die Injektion von Kaninchenserum bei bestimmten Kaninchen die Bildung präzipitierender Antikörper hervorruft. Er nannte diese Antikörper "Isopräzipitine". Unabhängig davon konnten CUMLEY und IRWIN (1940) nach kreuzweiser Absorption von Antiserum gegen das Serum zweier Taubenarten im Präzipitationstest die Seren der beiden Arten und ihrer F_1 -Hybriden unterscheiden, was vor dem Absorptionsversuch nicht möglich gewesen war. An Studien mit F_1 -Hybriden und Rückkreuzungshybriden zeigte dieselbe

Arbeitsgruppe, daß diese Antigenunterschiede genetisch bedingt waren (CUMLEY et al., 1941; CUMLEY und IRWIN, 1942; IRWIN und CUMLEY, 1942). Analoge Versuche mit Antihumanserum erbrachten die gleichen Ergebnisse (CUMLEY und IRWIN, 1943). Diese Arbeiten wurden zunächst nicht weitergeführt, bis OUDIN (1956 a u. b) die gleichen Beobachtungen wie seinerzeit SCHÜTZE machte. Er bezeichnete die intraspezifische Immunogenität von Serumproteinen als "Allotypie".

1962 vereinbarten DRAY et al. eine gemeinsame Terminologie, nach der man unter Allotypie das Auftreten bestimmter Proteine in verschiedenen Formen oder Allotypen versteht, die durch herkömmliche physikalische oder chemische Methoden nicht dargestellt werden können. Der Nachweis der allotypischen Formen eines Proteins geschieht mit Hilfe von Antikörpern, die der Organismus eines Empfängers gegen Proteine erzeugt, die sich allotypisch von seinen eigenen unterscheiden. Nach STEFFEN (1968) gehören Allotypen zur Gruppe der isogenen Antigene (Isoantigene). Allotypen werden durch zwei Arten antigener Spezifität determiniert, die isotypische und die allotypische. Der Isotyp ist allen Individuen einer Spezies gemeinsam, durch Allotypen

lassen sich Individuen mit gleicher isotypischer Spezifität in genetisch determinierte Gruppen unterteilen (BUSCHMANN und SCHMID, 1968). Nach der von DRAY et al. (1962) ausgearbeiteten Definition sind Isotyp und Allotyp Eigenschaften des gleichen Moleküls. Allotypen stellen genetisch bedingte, immunchemische Variationen isotypisch gleicher Moleküle dar (HILSCHMANN et al., 1970). Es handelt sich bei den Allotypen also um genetische Polymorphismen.

Bei Immunglobulinen wurde eine dritte Art von antigener Spezifität nachgewiesen, die als Idiotyp bezeichnet wird (KUNKEL et al., 1963; OUDIN und MICHEL, 1963; GELL und KELUS, 1964). Durch ihre idiotypische Spezifität lassen sich Antikörper unterscheiden, die von einzelnen Individuen oder einer bestimmten Gruppe von Individuen gegen das gleiche Antigen erzeugt werden. Ebenso können Antikörper, die ein einzelnes Individuum gegen verschiedene Antigene ausbildet, idiotypisch unterschieden werden (OUDIN, 1966 a u. b).

Während Isotyp, Allotyp und Idiotyp genetisch fixiert sind, stellen die sogenannten sekundären Heterotypen von Serumproteinen nicht genetisch determinierte

Varianten dar (ROELCKE, 1968). Sekundäre Heterotypien können sich auch in Veränderungen der Antigenität eines Proteins äußern. Sie sind durch physikalische oder chemische Einwirkungen, z. B. während der Lagerung von Seren, bedingt.

2.3. Allotypen bei Mensch und Tieren

Bei der Mehrzahl der bekannten Allotypen handelt es sich um Polymorphismen der Lipoproteine und der Immunglobuline. Die Kenntnis des Aufbaus und der Einteilung dieser Stoffklassen ist für die Beschreibung ihrer Allotypen notwendig.

2.3.1. Aufbau und Einteilung der Plasmalipoproteine

Unter den Globulinen des Blutplasmas besteht die physiologische Bedeutung der Lipoproteine darin, die wasserunlöslichen Lipide und Lipoide im wässrigen Milieu des Blutes zu transportieren. Es handelt sich um Verbindungen mit Molekulargewichten von 200 000 bis 10 000 Millionen, die globuläre oder ellipsoide Formen besitzen (KARLSON, 1966). Die einzelnen Lipoprotein-
gruppen weisen einen unterschiedlichen Proteingehalt auf.

So enthalten die fettreichsten Lipoproteine, die Chylomikronen, nur 1 bis 2 % Protein, das aus einem oder mehreren sogenannter Apolipoproteine aufgebaut ist. Die high-density Lipoproteine dagegen bestehen bis zu 55 % aus Protein. Umgekehrt bewegt sich der Fettanteil von 80 bis 95 % an Triglyceriden bei den Chylomikronen bis 3 % bei den high-density Lipoproteinen. Daneben enthalten die verschiedenen Stoffklassen noch unterschiedliche Mengen an verestertem und freiem Cholesterin, an Phospholipiden und an Kohlenhydraten (LEVY et al., 1971).

Die Struktur der Lipoproteine ist noch weitgehend hypothetisch. Man nimmt an, daß Proteinuntereinheiten ein sterisches Gerüst bilden, z. B. ein Dodekaeder, dessen Oberflächen mit Phospholipiden besetzt sind. Die weniger polaren Lipide sollen sich im Inneren dieses Gerüsts befinden, wo sie hauptsächlich über hydrophobe Bindungen an nicht polare Gruppen der Aminosäuren gebunden sind (LEWIS, 1971). Eine vergleichende Darstellung der verschiedenen Modellvorstellungen findet sich bei TRIA und SCANU (1969).

Tabelle 1 zeigt die Einteilung und einige wichtige Eigenschaften der Plasmalipoproteine. Die Unterteilung

der Lipoproteine in verschiedene Fraktionen erfolgt nach der Dichte, die mit sinkendem Lipidanteil zunimmt. Die Fraktionen können durch Ultrazentrifugation voneinander getrennt werden. Wegen ihrer unterschiedlichen Beweglichkeit in der Papierelektrophorese werden die very-low- und low-density Lipoproteine auch als β -Lipoproteine und die high-density Lipoproteine als α -Lipoproteine bezeichnet.

Tab. 1: Einteilung der Plasmalipoproteine

(modif. nach LEVY et al., 1971)

Bezeichnung	Molekulargewicht	Dichte (g/ml)	elektrophoret. Beweglichkeit	
			Papier	Agargel
Chylomikronen	$10^3 - 10^4 \times 10^6$	$< 0,95$	-	-
Very-low-density Lipoproteine (VLDL)	$5 - 10 \times 10^6$	$0,95 - 1,006$	Prä- β	α_2
Low-density Lipoproteine (LDL)	$2,1 - 2,6 \times 10^6$	$1,019 - 1,063$	β	α_2
High-density Lipoproteine (HDL)	200 000	$1,063 - 1,21$	α	α_1
Very-high-density Lipoproteine (VHDL)		$> 1,21$	-	?

2.3.2. Aufbau und Einteilung der Immunglobuline

Immunglobuline sind Plasmaproteine, deren Aufgabe es ist, nach Zufuhr immunogener Substanzen als Antikörper diese Fremdstoffe unschädlich zu machen. Nach dem von FLEISCHMAN et al. (1963), EDELMAN und GALLY (1964) und PORTER (1967) entwickelten Molekülmodell, das elektronenoptisch bestätigt werden konnte (VALENTINE und GREENE, 1967), besitzt dieses Molekül in seiner monomeren Form die Gestalt eines Ypsilon. Die beiden symmetrischen Hälften bestehen aus je zwei Polypeptidketten, die infolge ihres Molekulargewichts als "light chain" oder L-Kette (MG etwa 22 500) und als "heavy chain" oder H-Kette (MG etwa 50 000) bezeichnet werden. Der Zusammenhalt der Ketten erfolgt über Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen. Die offene Seite des Ypsilon, das Fab-Fragment, stellt den antigenbindenden Bereich dar (VALENTINE und GREENE, 1967). Die andere Seite, das Fc-Fragment, ist unter anderem für die Anheftung an Zellen und die Bindung von Komplement verantwortlich (HILSCHMANN et al., 1970).

Die Einteilung der Immunglobuline erfolgt nach der Art der H-Ketten, die sich für die einzelnen Klassen chemisch

und serologisch voneinander unterscheiden. Die einzelnen Fraktionen lassen sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Sedimentationskonstanten durch Zentrifugation oder auf Grund der unterschiedlichen Molekülgröße und Ladung durch Chromatographie trennen. Die Tabelle 2 zeigt die Einteilung und einige Eigenschaften der wichtigsten Immunglobulinklassen. Die Nomenklatur entspricht den von der Weltgesundheitsorganisation vorgeschlagenen Richtlinien (World Health Organization, 1964).

Tab. 2: Einteilung der Immunglobuline

(nach VAN OSS, 1967)

Bezeichnung	IgG	IgM	IgA
Vorliegend als	Monomer	Pentamer	Monomer oder Dimer
Molekulargewicht	150 000	1 000 000	150 000
Sedimentations- konstante	7 S	19 S	7 S (auch 10, 12 oder 17 S)
Menge im Serum (Mensch)	1,2 %	0,1 %	0,4 %

2.3.3. Übersicht über die Allotypien bei Mensch und Tieren

Mit Ausnahme des Menschen und einiger Versuchstierarten gibt es bis heute keine verbindlichen Nomenklaturregeln für Allotypen. In den meisten Fällen werden die Allotypen von ihren Erstbeschreibern nach der Stoffklasse benannt, der sie angehören, z. B. Lp für Lipoproteine oder Ig für Immunglobuline. Zudem fehlen internationale Vergleichstests zur Standardisierung der Antiseren, wie es in der Blutgruppenserologie der Fall ist. Eine vergleichende Darstellung der Allotypen, geordnet nach Stoffklassen, ist daher nur bedingt möglich. Im folgenden Text wurden die Allotypen deshalb in der Reihenfolge ihrer Beschreibung aufgeführt.

Tabelle 3 zeigt die Allotypien der Serumproteine des Menschen und der wichtigsten Versuchstier- und Haustierarten. Ein Teil dieser Allotypen konnte auch an Proteinen des Kolostrums nachgewiesen werden (FEINSTEIN, 1963; SELL, 1967; CONWAY et al., 1968, 1969 a u. b; RAPACZ und HASLER-RAPACZ, 1972; RAPACZ et al., 1972 b).

Tab. 3: Allotypen der Serumproteine bei Mensch und Tieren

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
α -Globulin	Maus		MuB ¹	CINADER u. DUBISKI (1963)
" "	Nerz			RAPACZ u. HASLER (1968)
" "	"	Pm	Pm ¹ , Pm ²	JANICKA (1972)
" "	"	Gpm	Gpm ¹	
α_1 -Glykoprotein	Schaf		A	BASH u. MILGROM (1972)
" "	"		B	
α_1 -Lipoprotein	Kan.	H1	H1 ¹	BERG et al. (1971)
α_1 -Arylesterase	"	S	S ¹ , S ²	KNIGHT et al. (1969)
α_1 -Antitrypsin	Msch.	Pi	F, I, M, S, V,	FAGERHOL (1968)
" "	"	"	W, X, Z	FAGERHOL u. GEDDE-DAHL (1969)
α_2 -Makroglob.	Kan.	z	Mtz ¹ , Mtz ²	KNIGHT u. DRAY (1968)
" "	"	t	Mtz ³ , Mtz ⁴	BERNE et al. (1970)
" "	Schaf	Ap	Ap ¹ , Ap ²	CURTAIN (1971)
" "	"	Gs	Gs ¹	RAPACZ et al. (1972 c)
" "	"		E	BASH u. MILGROM (1972)

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
α_2 -Makroglob.	Rind	Mc	Mc ¹	RAPACZ et al. (1968)
" "	Msch.	Xm	Xm ^a	BERG u. BEARN (1966)
" "	"		Xh	BUNDSCHUH (1966)
Haptoglobin	Kan.	h	Hph ¹ , Hph ²	CHIAO u. DRAY (1969)
β -Lipoproteine	Kan.	q	q ¹ , q ² , q ³ , q ⁴	KELUS (1968) ALBERS u. DRAY (1968 u. 1969)
" "	Schwein	Lpp	Lpp ¹ , Lpp ²	RAPACZ et al. (1970 a)
" "	"	"	Lpp ³	RAPACZ et al. (1970 b)
" "	"	"	3 Allele ?	RAPACZ et al. (1972 a)
" "	Schaf	Lps	Lps ¹	RAPACZ et al. (1970 d u. 1972 c)
" "	"	Lp	Lp ¹	CURTAIN (1971)
" "	Msch.	Ag	a, a ₁ , c, d, e,	ALLISON u. BLUMBERG (1961)
" "	"	"	v, t, x, y, z	HIRSCHFELD et al. (1964 u. 1968) BÜTLER u. ERUNNER (1970) BÜTLER et al. (1970) RITTNER (1970)

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
β -Lipoproteine	Msch.	Lp	Lp ^a , Lp ^x	BERG (1963)
" "	"	Ld	Ld ^a , Ld ^x	BERG (1965)
β -Globulin	Huhn			SKALBA (1964 u. 1966)
" "	Schwein			TIKHONOV et al. (1968)
" "	"			LANG (1968)
" "	Schaf		s, a	SKIBA (1972)
Immunglobuline	Maus		γ ^{B^A}	KELUS u. MOOR-JANKOWSKI (1961 a u. b)
"	"		MuA ¹ , MuA ²	DRAY et al. (1963)
"	"	Asa	a ¹ , a ² , a ³ ,	DUBISKI u. CINADER (1963)
"	"	"	a ⁴ , a ⁵	WUNDERLICH u. HERZENBERG (1963)
"	"	"	a ^{1'} , a ^{1''}	LIEBERMANN u. DRAY (1964)
"	"	Ig-1	Ig-1 ^a bis Ig-1 ^h	DRAY et al. (1965)
				HERZENBERG (1964)
				HERZENBERG et al. (1965)

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
Immunglobuline	Maus	Ig-2	Ig-2 ^a , Ig-2 ^b ,	HERZENBERG (1964)
"	"	"	Ig-2 ^c	
"	Meerschw.			BENACERRAF u. GELL (1961)
"	Ratte			WISTAR (1969)
"	"		Ra ¹	BARABAS u. KELUS (1967)
"	"	RI-1	RI-1 ^a , RI-1 ^b	GUTMAN u. WEISSMAN (1971)
"	"	SD	SD ¹	ARMERDING (1971)
"	"	W	W ¹	
"	Kan.	a	a ¹ , a ² , a ³	OUDIN (1956 a u. b) FEINSTEIN et al. (1963) KELUS u. GELL (1963) TODD (1963) PERNIS et al. (1968)
"	"	b	b ⁴ , b ⁵ , b ⁶ , b ⁹	OUDIN (1956 a u. b) KELUS u. GELL (1963) DUBISKI u. MULLER (1967)

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
Immunglobuline	Kan.	c	c ⁷ , c ²¹	MAGE et al. (1968) GILMAN-SACHS et al. (1969)
"	"	a ₂	A ⁸ , A ¹⁰	HAMERS et al. (1965 u. 1966)
"	"	d	d ¹¹ , d ¹²	MANDY u. TODD (1968 u. 1970)
"	"	e	e ¹⁴ , e ¹⁵	DUBISKI (1969) LANDUCCI-TOSI et al. (1970)
"	"	Ms	Ms ¹ , Ms ² , Ms ³ ,	KELUS u. GELL (1965)
"	"	"	Ms ⁴ , Ms ⁵ , Ms ⁶	SELL (1966) KELUS u. PERNIS (1971)
"	"	f	f ¹ , f ² , f ³ ,	CONWAY et al. (1968 u.
"	"	"	f ⁴ , f ⁵	1969 a u. b)
"	Huhn			SKALBA (1966)
"	"			MC DERMID et al. (1969)
"	"	a	Aa ¹ , Aa ²	
"	"	b	Ab ¹ , Ab ²	
"	"	c	Ac ¹ , Ac ² , Ac ³ ,	DAVID et al. (1969)
"	"	"	Ac ⁴	

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
Immunglobuline	Ente			KAMINSKI u. LIGOUZAT (1964)
"	Pute			GASPARSKI u. STEVENS (1970)
"	Schwein	G1	G1 ^a , G1 ^b	RASMUSEN (1965)
"	"			LANG (1968)
"	"			NIELSEN (1972)
"	Schaf	Ig-1	Ig-1 ¹ , Ig-1 ²	CURTAIN (1971)
"	"	Ig-2	Ig-2 ¹	
"	Rind	iA	iA ¹	MILLOT (1966 u. 1972)
"	"	iB	iB ¹	
"	"			SPOONER (1968)
"	"	Ic	Ic ¹	RAPACZ et al. (1970 c)
"	"	bva	bva ¹	BLAKESLEE et al. (1971)
"	"	bvb	bvb ¹	
"	"	bvc	bvc ¹	RAPACZ u. HASLER- RAPACZ (1972)

Fortsetzung Tab. 3

Protein	Spezies	Genort	Bekannte Allele	Autoren
Immunglobuline	Msch.	Gm-systeme	24 Faktoren	alle zit. n. GRUBB (1970)
"	"	Isf	Isf ¹	
"	"	Inv	Inv ¹ , Inv ² ,	
"	"	"	Inv ³	
"	"	Am		

Zahlreiche Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von Allotypen wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt, wobei Immunglobulin-Allotypen im Zytoplasma von Lymphknotenzellen (COLBERG und DRAY, 1963 u. 1964; PERNIS et al., 1965) und auf der Zellmembran von lymphoiden Zellen nachgewiesen wurden (WOLF et al., 1970; DAVIE et al., 1971; GREAVES, 1971).

Mit Hilfe neuer biochemisch-analytischer Methoden konnte die Erscheinung der Allotypie auch auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. SMALL et al. (1965 u. 1966) und FRANGIONE (1968) zeigten an Fingerprints von Peptiden durch spezifische Peptidmuster der allotypischen Proteine, daß der verantwortliche Genort zumindest teilweise die Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteinmoleküle kontrolliert. Durch Bestimmung der Aminosäuresequenz der Polypeptidketten von Immunglobulinen konnte schließlich gezeigt werden, daß spezifische, genetisch determinierte Austausche von Aminosäuren für die Allotypie verantwortlich sind (REISFELD et al., 1965; INMAN und REISFELD, 1968; KOSHLAND et al., 1968; REISFELD et al., 1968; HARRINGTON und TERRY, 1969). Zwar spielen nach Untersuchungen von STEMKE (1971) die Tertiär- und Quartärstrukturen eine entscheidende Rolle für die Immunogenität des allotypischen

Proteins, diese werden wiederum von den Primärstrukturen beeinflusst (DICKERSEN und GEIS, 1969). Im Gegensatz dazu sahen FLORENT et al. (1970), nach enzymatischen Untersuchungen von Immunglobulin H-Ketten, prosthetische Kohlenhydrate als Ursache der Allotypie an.

2.3.4. Die Allotypen des Rindes

Bei stärkegelelektrophoretischen Untersuchungen von Rinderserum beobachtete ASHTON (1958) das Fehlen des slow- α -Globulins im Serum zweier von 2 500 untersuchten Guernsey-Rindern. Er vermutete zwei Allele, s- α^A und s- α^O , wobei s- α^A in homozygoter wie in heterozygoter Form die Ausbildung des s- α -Globulins verursacht. GAHNE (1964) machte die gleiche Beobachtung bei schwe-dischen Rindern. Er immunisierte s- α -A Rinder mit s- α -O Serum und erhielt präzipitierende Antikörper gegen das fehlende Globulin im Donorserum. GAHNE identifizierte das Antigen als α -2-Makroglobulin (19 S α -2-Glycoprotein).

MILLOT (1966 a u. b) gelang der Nachweis zweier weiterer Allotypen, als er im Serum einiger Rinder einen natürlich vorkommenden Antikörper fand, der mit Isoimmunserum

sensibilisierte Rindererythrozyten agglutinierte. "Normalseren" vermochten diese Reaktion zu hemmen. MILLOT vermutete im Serum dieser Tiere einen allotypischen Faktor A. Weiterhin beschrieb er einen zweiten Faktor B, den er mit Hilfe eines Antiglobulinserums darstellen konnte. Das Antiglobulinserum gewann er aus Ziegen, die mit Präzipitaten von Ovalbumin und Rinderantiovalbumin immunisiert worden waren. Seren, die die Agglutination sensibilisierter Erythrozyten mit dem heteroimmunen Antiglobulinserum hemmen konnten, enthielten demnach den Faktor B. MILLOT vermutete, daß es sich wie bei den Gm-Faktoren des Menschen um Allotypen des IgG handelte. In einer weiteren Arbeit (1970) konnte er drei "Hemmungsfaktoren" im Rinderserum feststellen. Die Allotypen A und B, nun iA und iB genannt, wurden als IgG identifiziert. Ihre Übertragung geschieht durch zwei nicht-allele Gene. Der dritte "Hemmungsfaktor", iC, schien kein Allotyp zu sein, sondern zeigte starke immunologische Ähnlichkeit mit dem Blutgruppenantigen J.

IANELLI et al. (1966; zit. n. RAPACZ et al., 1968) absorbierten ein Heteroantiserum gegen Rindermischserum aus Kaninchen mit Seren von einzelnen Rindern. Dieses absorbierte Serum präzipitierte bei einigen Rindern mit

einem α -Globulin. Da der Allotyp in vivo instabil war, konnte eine genetische Analyse nicht durchgeführt werden.

1968 berichteten RAPACZ und HASLER von ihren Arbeiten über Allotypen des Rindes. Dabei handelte es sich um die in Tabelle 4 aufgeführten Faktoren. Über den Allotyp Mc-1 liegt eine ausführliche Arbeit vor (RAPACZ et al., 1968). Danach wurden Holstein-Friesian Kühe mit Ammoniumsulfatfraktionen von Brown Swiss- und Ayrshire-Seren in Freund'schem Adjuvans immunisiert. Mit Hilfe des gewonnenen Isoantiserums konnte im Geldiffusionstest und in der Immunelektrophorese der Allotyp Mc-1 dargestellt werden. Mc-1 wird durch das dominante Allel Mc¹ auf dem autosomalen Locus Mc kontrolliert. Die Genfrequenz von Mc-1 ist je nach Rasse verschieden: von 0,5 bei Charolais bis 0,01 bei Guernsey. Der Nachweis von Mc-1 ist ein wertvolles Hilfsmittel in der Zwillingsdiagnostik, da dizygote Zwillinge mit Blutgruppenchimärismus keinen Chimärismus für Mc-1 aufweisen sollen. Mit Hilfe von Ultrazentrifugation, Reduktion und anschließender Alkylierung, Gel-filtration und präparativer Stärkegelelektrophorese wurde Mc-1 als Makroglobulin identifiziert. BLAKESLEE (1970; zit. n. BLAKESLEE et al., 1971) zeigte, daß es sich bei Mc-1 nicht, wie zunächst vermutet, um ein IgM, sondern um ein α -Globulin handelt.

Tab. 4: Allotypen des Rindes

(nach RAPACZ und HASLER, 1968)

Vorläufige Nomenklatur	Serumfraktion	Stärke der Antigen-Antikörper-Reaktion	Art des Antiserums (AS)	beobachtete Frequenz
Mc-1	Makroglobulin, MG 200 000, 19 S	mittel - schwach	Iso-AS	3-76 %
	MG 200 000, 19 S	schwach	Iso-AS	>60 %
	MG 200 000, 19 S	sehr schwach	Iso-AS	<40 %
HD-Lpc-1	high-density Lipoprotein, MG 200 000	mittel - schwach	Iso-AS	<20 %
	Lipoprotein	sehr schwach	Iso-AS	?
EC-1	intraerythrozytäres Protein, MG etwa 80 000	mittel	Iso-AS	15-30 %
	α - Globulin	mittel	Iso-AS	<1 %
	variables Ig (IgA ?)	mittel	Hetero-AS	variabel
	Albumin	mittel	natürlich vorkommende Antikörper	<1 %
	Immunglobulin ?	schwach		20 %
Igc-1	IgG MG 160 000, 7 S	mittel - schwach	Iso-AS	15 %

SPOONER (1968) erhielt durch Isoimmunisierung mit Natriumsulfatfällungen aus Serum und Freund'schem Adjuvans Antiseren, mit denen er drei Allotypen darstellen konnte. Bei der Immunelektrophorese und der chromatographischen Auftrennung der positiven Seren zeigten sich die Antigenaktivitäten im IgG-Bereich.

Mit Hilfe eines hämolysierenden Isoantiserums, das an homologe Erythrozyten adsorbiert worden war, fanden RAPACZ et al. (1970 c) beim Polnischen Rotvieh ein IgG-Isoantigen. Die genetischen Untersuchungen zeigten, daß der Allotyp Ic-1 dominant vererbt wird. Er war nur bei Tieren, die älter als ein Jahr waren, nachweisbar.

BLAKESLEE et al. (1971) verwendeten gereinigtes IgG und Freund'sches Adjuvans zur Isoimmunisierung von Holstein-Friesian Kühen. Mit den erhaltenen Isoantiseren konnten sie im Geldiffusionstest, in der Immunelektrophorese, im Radialdiffusionstest und im Hämolysenhemmungstest zwei Spezifitäten, A-1 und B-1, darstellen. Sulfitolyse und anschließende Gelfiltration ergaben, daß A-1 auf dem Fc-Stück von IgG₂ H-Ketten und B-1 auf der L-Kette von Immunglobulinen lokalisiert sind. B-1 findet sich bei IgG, IgM und IgA. A-1 und B-1 werden von den dominanten

Allelen bva^1 und bvb^1 auf den autosomalen Genorten bva und bvb kontrolliert, die unabhängig voneinander segregieren. Bei Holstein-Friesian liegt die Genfrequenz für bva^1 bei 0,8 und diejenige für bvb^1 bei 0,12. Die Genfrequenz von bva^1 ist bei allen untersuchten Rassen relativ hoch ($>0,63$). Eine Ausnahme macht nur die amerikanische Rasse Hereford (0,18). Die Genfrequenz von bvb^1 reicht von 0,08 bei Guernsey und Brown Swiss bis 0,00 bei Ayrshire, Jersey, Longhorn und Red Angus. Den allotypischen Marker, $bvc-1$, für die Immunglobulin-subklasse IgG_1 fanden RAPACZ und HASLER-RAPACZ (1972) nach Isoimmunisierung mit Immunglobulin, das an homologe Erythrozyten adsorbiert worden war. Der Allotyp $bvc-1$ war auch im Kolostrum nachweisbar. Er wird durch das autosomale Gen bvc^1 determiniert.

2.3.5. Die Allotypen anderer landwirtschaftlicher Nutztiere

Unter den landwirtschaftlichen Nutztieren wurden allotypische Polymorphismen auch beim Schaf, beim Schwein und beim Huhn beschrieben.

Beim Schaf fanden RAPACZ und HASLER (1968) zwei

allotypische Marker des Immunglobulins. Für drei Isoantiseren konnte der korrespondierende Allotyp nicht identifiziert werden. Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb den dominant vererbten Allotyp Lps-1, ein low-density Lipoprotein, und den ebenfalls dominanten Allotyp Gs-1, ein α -2-Globulin (RAPACZ et al., 1970 d u. 1972 c). CURTAIN (1971) stellte durch Kreuzimmunisierung mit Serum verschiedener Rassen eine Reihe von Isoantigenen dar. Die Antigene Ap-1 und Ap-2, die durch kodominante autosomale Allele kontrolliert werden, wurden beim α -2-Makroglobulin nachgewiesen. Der gleiche Vererbungsmodus gilt für den Allotyp Lp-1 beim β -Lipoprotein. Die Allele Ig-1¹ und Ig-1² sind verantwortlich für Marker des IgG₁. Ig-1¹ ist gekoppelt mit dem Allel Ig-2¹, das einen Allotyp des IgG₂ determiniert. SKIBA (1972) berichtete über zwei weitere Allotypen, s und a. Es handelt sich dabei um β -Globuline, die jedoch nicht näher genetisch untersucht worden sind. Mit Hilfe eines Isoantiseraums gegen Glaskörper des Auges stellten BASH und MILGROM (1972) einen Allotyp A beim α -Glykoprotein dar. In der Folge fanden sie durch Isoimmunisierung mit Serum sieben weitere Isoantigene, B, C, D, E, F, G und H. Bei dem Allotyp B

handelt es sich ebenfalls um ein α -Glykoprotein, C, E und H sind α -2-Makroglobuline. Die übrigen Faktoren konnten nur durch ihre Beweglichkeit in der Immunelektrophorese charakterisiert werden. D ist ein α -2-Globulin, F und G sind β -Globuline. Genetische Untersuchungen zeigten, daß A, B und E durch nicht-gekoppelte, nicht-allele, autosomale, dominante Gene kontrolliert werden. Für die anderen Allotypen konnte der Vererbungsmodus noch nicht eindeutig geklärt werden.

Die ersten Untersuchungen über Allotypen der Serumproteine des Schweines stammen von RASMUSEN (1965). Mit Hilfe hämagglutinierender Antiseren stellte er zwei Isoantigene dar, die von den kodominanten, autosomalen Allelen $G1^a$ und $G1^b$ gesteuert werden und in drei Phänotypen $G1-(a+ b-)$, $G1-(a+ b+)$ und $G1-(a- b+)$ auftreten. Über neun verschiedene Allotypen mit β -Mobilität berichteten TIKHONOV et al. (1968). Sie werden dominant vererbt, fünf von ihnen sind Allele eines Genorts. LANG (1968) beschrieb multispezifische Isoantiseren, die mit Antigenen des α -, β - und γ -Bereichs präzipitierten. Eines der Antigene konnte chromatographisch als 7 S - Globulin identifiziert werden. Bei polnischen Schweinerassen stellte DUNIEC (1972) zwei Isoantigene

L und G dar, die er auf Grund der Häufigkeitsverteilung in den untersuchten Rassen als genetisch bedingt ansah. Bei der Untersuchung natürlich vorkommender Isoantikörper gegen Immunglobuline fand NIELSEN (1972) beim Dänischen Landschwein die vier Isoantigene a, b, c und d. Diese Immunglobulin-Allotypen werden wahrscheinlich durch Allele eines Genorts oder mehrerer sehr eng gekoppelter Genorte kontrolliert. Zwei der Isoantigene dürften mit den von RASMUSEN (1965) beschriebenen Allotypen identisch sein. Ein System von Allotypen des low-density Lipoproteins wurde von RAPACZ et al. (1970 a u. b, 1972 a) dargestellt. Die Isoantigene Lpp-1, Lpp-2 und Lpp-3 werden von kodominanten Allelen kontrolliert. Für drei weitere Antigene werden Allele oder sehr eng gekoppelte Gene angenommen. Auch natürlich vorkommende Isopräzipitine gegen diese Allotypen, vornehmlich gegen Lpp-3, wurden gefunden (RAPACZ et al., 1970 e). Eines dieser Isopräzipitine reagierte mit menschlichem Serumlipoprotein. Präzipitine gegen low-density Lipoproteine fanden sich auch in Isoantiseren, die durch Immunisierung mit Vollblut gewonnen worden waren (RAPACZ et al., 1972 d).

Beim Huhn konnte SKALBA (1964 u. 1966) insgesamt zwölf

Isoantigene nachweisen. Die Faktoren GA-4, GA-5, GA-6 und GA-8 sind γ -Globuline, dagegen handelt es sich bei den Faktoren GA-1, GA-2, GA-3, GA-7, GA-10, GA-11 und GA-12 um β -Globuline. Alle zwölf Antigene scheinen hereditär zu sein, wobei allerdings für die γ -Globulin-Phänotypen die Beobachtungswerte von den für die genetische Hypothese erstellten Erwartungswerten abweichen. Drei Gruppen von Isoantigenen, vier IgG-Allotypen, acht IgM-Allotypen und drei natürlich vorkommende Isoantikörper, bei denen das korrespondierende Antigen nicht ermittelt werden konnte, wurden von MC DERMID et al. (1969) beschrieben. Unabhängig davon fanden DAVID et al. (1969) ebenfalls drei Systeme von Allotypen. Sie werden von den Allelen Aa^1 und Aa^2 des Locus a, Ab^1 und Ab^2 des Locus b und Ac^1 , Ac^2 , Ac^3 und Ac^4 des Locus c gesteuert. Die Allotypen des Locus a wurden als IgG identifiziert.

2.3.6. Allotypen und polygene Eigenschaften

Beziehungen zwischen monogenen Merkmalen und ökonomisch oder hygienisch wichtigen polygenen Merkmalen sind in der Tierzucht und Veterinärmedizin von großer Bedeutung (u. a. NEIMANN-SÖRENSEN und ROBERTSON, 1961; RENDEL, 1961;

MITSCHERLICH, 1965; BRILES und BRILES, 1972; HADARAG und BERCEA, 1972). Beim Rind gibt es zahlreiche Untersuchungen über Beziehungen zwischen monogenen Merkmalen und Leistungseigenschaften (Übersicht bei SINGH, 1972) und über Beziehungen zwischen Blutgruppen und hygienischen Faktoren (MITSCHERLICH et al., 1966; KOCH et al., 1968; CARR et al., 1972). Untersuchungen über die Genetik der Immunantwort bei Versuchstieren ergaben, daß genetische Beziehungen zwischen Immunantwort und Histokompatibilitätsallelen bestehen (u. a. MC DEVITT und TYAN, 1968; BLUESTEIN et al., 1971 a u. b; WÜRZBURG, 1971; BENACERRAF und MC DEVITT, 1972; GÜNTHER et al., 1972).

Arbeiten über Beziehungen von Allotypen zu polygenen Merkmalen bei Haustieren lagen in der verfügbaren Literatur nicht vor. Bei Versuchstieren jedoch erlauben die umfangreichen Kenntnisse über den Polymorphismus der Immunglobuline eine Markierung dieser Moleküle bei Studien über die Antikörperbildung und Antikörperspezifität. Übersichtsdarstellungen zu diesem umfangreichen Themenkreis finden sich bei HILSCHMANN et al., (1969 u. 1970) und SMITH et al. (1971).

Beim Kalb wurden allotypische Marker der Immunglobuline zum Studium der laktogenen und autogenen Immunglobuline benutzt (RAPACZ et al., 1972 b).

Die Beziehungen zwischen allotypischer Spezifität und Antikörperspezifität wurden von RIEDER und OUDIN (1963) eingehend untersucht. Sie stellten in Übereinstimmung mit anderen Autoren (DRAY, 1962; GELL und KELUS, 1962; HARBOE et al., 1962; STEMKE, 1964; MERRYMAN et al., 1967; SPRING et al., 1970) fest, daß eine solche Beziehung nicht mit Sicherheit angenommen werden kann. Auch beim Menschen konnte ein Einfluß der Gm- und Inv-Faktoren auf die Antikörperspezifität nicht nachgewiesen werden (HILSCHMANN et al., 1970). Bei den Immunglobulin-Allotypen des Kaninchens beobachteten MANCINI et al. (1969) und DUBISKI (1970) einen Selektionsvorteil bei bestimmten Faktoren. Auf Grund dieser Befunde vermutete DUBISKI (1972), daß durch den Einfluß einer allotypischen Spezifität auf die Struktur der Polypeptidketten auch die Avidität des Antikörpers verändert werden könnte. Untersuchungen an einfach aufgebauten Haptenen bei Mäusen zeigten, daß Antikörperspezifität und ein bestimmtes Allel eines Chromosomenabschnittes in den Zellklonen gemeinsam übertragen werden (WEILER und WEILER, 1968).

Zu einer ähnlichen Aussage kamen BIOZZI et al. (1970), als sie Mäuse auf starke bzw. schwache Antikörperbildung selektierten. Dabei zeigte sich, daß die "high responder" homozygot oder heterozygot für solche Kopplungsgruppen der H-Kette geworden waren, die ausschließlich in bestimmten Inzuchtlinien angetroffen wurden. Demgegenüber waren die "low responder" homozygot für eine Kopplungsgruppe der H-Ketten, die sonst nur als Rekombinant bei Wildmäusen gefunden wurde. Für die Beziehungen zwischen Allotypen und hygienisch wichtigen Merkmalen gibt es einige interessante Hinweise. So fanden DAVID und FLETCHER (1971), daß bei Hühnern nach Übertragung eines lymphoiden Tumors bestimmte Immunglobulin-Allotypen nicht mehr nachweisbar sind. Diese Erscheinung wurde als immunologisches Enhancement interpretiert. Es wurde dabei die Möglichkeit angedeutet, Allotypen als Markierungssubstanzen zur Diagnose neoplastischer Erkrankungen einzusetzen. Ähnliche Anwendungsmöglichkeiten bestehen auch für die Lipoprotein-Allotypen. Die Markierung von Lipoproteinen könnte ein wertvolles Hilfsmittel beim Studium der Ätiologie und Pathogenese von arteriosklerotischen Erkrankungen sein (BERG et al., 1971).

3. Material und Methodik

3.1. Das Tiermaterial

Zur genetischen Beschreibung des Allotyps wurde ein Tiermaterial untersucht, in dem die drei wichtigsten deutschen Rinderrassen, Deutsche Schwarzbunte, Deutsche Rotbunte und Deutsches Fleckvieh, vertreten waren.

Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des untersuchten Tiermaterials.

Tab. 5: Zusammensetzung des untersuchten Tiermaterials

Rasse	Fami- lien	Mutter- Nachkom- men-Paare	Zwillings- paare	Einzeltiere		Gesamt- zahl
				weibl.	männl.	
Deutsche Schwarz- bunte	15	281	7	3	69	639
Deutsche Rotbunte		69	3			144
Deutsches Fleckvieh					105	105

Bei den Schwarzbunten und Rotbunten handelte es sich zum größten Teil um Mutter-Nachkommen-Paare (Halbfamilien). Lediglich bei den Schwarzbunten wurden auch 15 vollständige Familien erfaßt. Wegen ihrer geringen Zahl wurden diese Familien bei der genetischen Auswertung den Halbfamilien zugerechnet.

Die Blutproben von den schwarzbunten und rotbunten Tieren waren zur Blutgruppenbestimmung in das Tierärztliche Institut der Universität Göttingen eingesandt worden. Zur Konservierung und Gerinnungshemmung enthielten die Proben zu einem Viertel ihres Volumens folgende Lösung: 20 g Natriumzitrat, 5 g Natriumchlorid und 0,2 g Kaliumzyanid auf 1 000 ml destilliertes Wasser. Die Proben wurden am Tag ihres Eintreffens zehn Minuten lang bei 1 500 g zentrifugiert und das überstehende Plasma bis zur Untersuchung bei $- 25^{\circ}$ C gelagert. Die Seren der Fleckviehrinder stammten von zwölf Wochen bis dreizehn Monate alten Bullen der Mastprüfungsstation Westerschondorf/Obb.,⁺⁾

⁺⁾ Die Seren wurden dankenswerterweise von Herrn L. Erhard, Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung, Tierzuchtforschung e. V., München, zur Verfügung gestellt.

3.2. Die Immunisierungsverfahren

Für methodische Arbeiten und als Kontrollantiserum wurden Anti-Rind-Seren vom Kaninchen gewonnen. Die Darstellung des Allotyps erfolgte mit Isoantiseren vom Rind.

3.2.1. Die Gewinnung der Anti-Rind-Seren vom Kaninchen

Zur Gewinnung präzipitierender Antikörper gegen Rinder-serum wurden Kaninchen immunisiert. Es handelte sich um weibliche und männliche Tiere verschiedener Rassen, alle Tiere älter als ein halbes Jahr. Als Antigen wurde ein Mischserum aus 186 Serumproben schwarzbunter Rinder verwendet. Am ersten Tag bekamen die Tiere 1 ml Mischserum, 1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, intravenös appliziert. Am zweiten Tag erhielten die Tiere 1 ml Mischserum in 1 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit) subkutan. Diese Reihenfolge wurde an aufeinanderfolgenden Tagen zehnmal wiederholt. Im Fall der intravenösen Injektion wurden der Lösung dabei 0,2 ml Nephritin^R (Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Hannover) zur Schockprophylaxe hinzugefügt. Vierzehn Tage nach Beginn der Immunisierung folgten in wöchentlichen Abständen Blutentnahmen aus der Ohrvene zur Bestimmung der Präzipitationstiters der Seren

im Geldiffusionstest. Fiel der Titer 1 : 16 oder höher aus, wurden aus der Ohrvene 20 bis 30 ml Blut entnommen und nach zwölfstündigem Stehen bei Zimmertemperatur zweimal 15 Minuten bei 1 500 g zentrifugiert. Die danach als Überstand gewonnenen Seren wurden bei - 25° C gelagert.

3.2.2. Die Gewinnung der Isoimmunseren vom Rind

Zur Immunisierung standen pluripare, schwarzbunte Kühe des Versuchsgutes Relliehausen des Instituts für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen zur Verfügung. Insgesamt wurden drei Immunisierungszyklen durchgeführt. In der ersten Immunisierungsperiode wurden 15 Tiere in acht- bis zehntägigem Abstand insgesamt neunmal immunisiert. Als Antigen dienten 5 ml Mischserum mit 5 ml einer 5 %igen Lösung von Diäthylaminoäthyl-Dextran (DEAE-D; Pharmacia, Uppsala) als Adjuvans, intramuskulär injiziert. Dieses Adjuvans wurde nach WITTMANN (1970) hergestellt, indem 5 % DEAE-D unter ständigem Rühren in destilliertem Wasser bei 30° C gelöst wurden. Das Einstellen der stark sauer reagierenden Lösung auf pH 7,6 erfolgte mit gesättigter Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung (Tris-Lösung).

Vor der ersten Immunisierung wurden von allen Tieren Seren gewonnen. Die Seren reagierten im Geldiffusionstest negativ mit dem zur Immunisierung verwendeten Serum (Donorserum). Nach fünf Immunisierungen präzipitierte das Serum Nr. 604 mit zwei Seren, die nicht im Mischserum enthalten waren. Infolge der geringen Konzentration des Isoantigens im Mischserum und des niedrigen Antikörpertiters im Serum des Empfängers war bei der Immundiffusion von Serum Nr. 604 gegen das Donorserum kein sichtbarer Antigen-Antikörper-Komplex nachweisbar. Nach weiteren drei Immunisierungen präzipitierte das Serum Nr. 604 bis zu einer Verdünnung von 1 : 4 jedoch auch mit dem Mischserum und verschiedenen Einzelseren. Alle anderen Seren enthielten keine nachweisbaren Isoantikörper.

Nach einer Pause von fünf Wochen folgte der zweite Immunisierungszyklus. Drei Tiere waren inzwischen aus dem Bestand abgegangen; an ihre Stelle traten weitere vier pluripare, schwarzbunte Kühe. In dieser zweiten Immunisierungsperiode wurden Einzelseren von sechs schwarzbunten Rindern, einer Gelbviehkuh und einem rotbunten Bullen verwendet. Die Dosis pro Injektion betrug 5 ml Serum mit 5 ml DEAE-D-Adjuvans, intramuskulär

injiziert. Die Injektionen erfolgten insgesamt sechsmal in wöchentlichem Abstand. Vor Beginn der Immunisierung reagierten alle Rezeptoren im Geldiffusionstest negativ mit den entsprechenden Donorseren. Nach vier, fünf und sechs Wochen wurde Blut entnommen. Im Geldiffusionstest zeigten sich bei den Seren von acht Tieren Präzipitate mit den Donorseren. Daraufhin wurde von diesen acht Tieren aus je 1,5 l Blut Serum gewonnen und bei $- 25^{\circ} \text{C}$ gelagert.

Aus technischen Gründen erfolgte bereits vier Wochen nach Beendigung der zweiten Immunisierungsperiode eine zweimalige Boosterinjektion mit 10 ml des Donorserums aus der zweiten Immunisierungsperiode und 5 ml Adjuvans. Unmittelbar vor dem zweiten Booster, sowie sieben und zehn Tage danach, wurde Blut entnommen. In fünf der Seren, die bereits vorher Isoantikörper enthalten hatten, waren wiederum Isoantikörper nachweisbar. Zusätzlich konnten in vier weiteren Seren Isoantikörper festgestellt werden. Während das Serum Nr. 604 einen Präzipitationstiter von 1 : 4 aufwies, reagierten alle anderen Seren nur mit dem unverdünnten Antigen. Seren der positiven Tiere wurden, wie schon beschrieben, bis zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

3.3. Methoden zum Nachweis und zur Beschreibung von Isoantigenen und Isoantikörpern

3.3.1. Der Geldiffusionstest nach OUCHTERLONY

Die grundlegenden Gesetze der Immundiffusion wurden von OUDIN (1946, zit. n. BACKHAUSZ, 1967) dargestellt und von OUCHTERLONY (1948, zit. n. CROWLE, 1961) weiter ausgeführt. In dieser Arbeit wurde die vielfach angewendete Methode der Immundiffusion im Gelmilieu benutzt. Antigen und Antikörper diffundieren durch eine Gelschicht aufeinander zu, wobei sich an einer bestimmten Stelle ein sichtbarer Antigen-Antikörper-Komplex bildet. Art und Lage dieses Präzipitats hängen von mehreren Faktoren ab. Unter der Voraussetzung, daß präzipitierende Antikörper vorliegen, entsteht an der Stelle, wo im Gel nach einer bestimmten Diffusionszeit serologisch äquivalente Konzentrationen von Antigen und Antikörper vorliegen, das erste Präzipitat. Werden äquivalente Konzentrationen aufrechterhalten, so verändert sich die Lage des Präzipitats nicht, nimmt aber an Intensität zu. Antigenüberschuß, bei Pferdeantiseren auch Antikörperüberschuß, führt zur Bildung löslicher Komplexe. Die Lage eines Präzipitats hängt zum größten Teil von den Molekulargewichten der beteiligten Substanzen ab. Die mögliche Anzahl an Präzipitationszonen entspricht

der Zahl der Antigen-Antikörper-Systeme, sofern unter diesen Systemen keine serologischen Verwandtschaften bestehen. Ausführliche Darstellungen über die Theorie der Immundiffusion in Gelen, über die verschiedenen Techniken und Anwendungen finden sich bei OUCHTERLONY (1958, 1962 u. 1968), CROWLE (1961), KABAT und MAYER (1961), BACKHAUSZ (1967) und STEFFEN (1968).

Eine besondere Bedeutung hat die von OUCHTERLONY entwickelte und als "Ouchterlony-Test" bekannte Methode der radialen Doppeldiffusion erlangt. Sie zeichnet sich durch folgende Anwendungsmöglichkeiten aus:

- a) Die Bestimmung von Antigen- und Antikörperkonzentration (BACKHAUSZ, 1967),
- b) die Reinheitsprüfung von Antigenen (STEFFEN, 1968) und
- c) der serologische Vergleich von Antigenen mit Hilfe der "three basin plate technique" (OUCHTERLONY, 1958).

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde der Ouchterlony-Test nach folgender Methode durchgeführt:

a) Bereitung des Gels

Pro 100 ml Gelpuffer nach KUBEK (1970) (s. Anhang 1, S. 94)

wurde 1 g Agar (Difco Agar Special Noble; Difco Lab., Detroit) im kochenden Wasserbad gelöst. Der Verdampfungsverlust wurde durch destilliertes Wasser ersetzt. Bei den Versuchen mit isolierten Lipoproteinen wurde Agarose (Agarose reinst; Serva, Heidelberg) an Stelle von Agar verwendet, um Komplexbildungen zwischen den polaren Gruppen des Agars und den Lipoproteinen zu vermeiden. Zur Verhinderung von Keimwachstum erhielten die Gellösungen einen Zusatz von 1 : 10 000 an Äthylmercurithiosalizylsäure-Natriumsalz (Merthiolat^R; Serva, Heidelberg). Eine kontrastreichere Darstellung der Präzipitate ließ sich durch Hinzufügung von Methylorange zur Gellösung in einer Konzentration von 1 : 3 000 erreichen.

b) Vorbereitung der Schalen

In Kunststoff-Petrischalen, die auf einem waagrecht justierten Nivelliertisch lagen, wurden 20 ml Gellösung pipettiert. Sobald die Lösung geliert war, wurden die Platten mit Deckeln versehen und mit den Deckeln nach unten mindestens 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt.

c) Ausstanzen der Reagenzienbehälter

Zum Ausstanzen der Reagenzienbehälter diente eine Schablone von der in Abb. 1 dargestellten Anordnung.

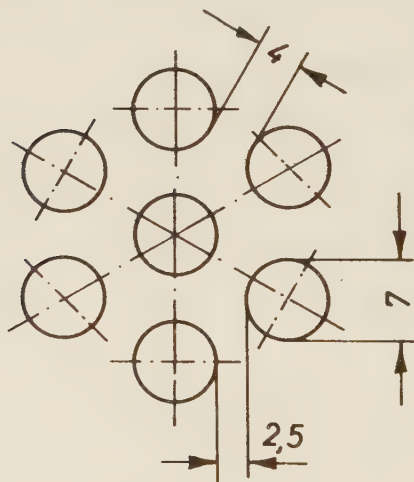


Abb. 1: Abdruck der Schneideschablone für den Ouchterlony-Test

Die mit der Schablone ausgestanzten Agarzylinder wurden mit einer Wasserstrahlpumpe herausgesaugt.

d) Füllen der Reagenzienbehälter

Die Behälter wurden mit einer 100 μ l Konstriktionspipette bis zum Rand gefüllt. In den zentralen Behälter kam das Antiserum, die peripheren Behälter nahmen die Testseren (Antigen) auf.

e) Inkubation der Schalen

Die mit Deckel versehenen Schalen wurden 48 Stunden lang bei 37° C inkubiert.

f) Registrierung der Ergebnisse

Art, Zahl und Lage der Präzipitationsbögen ließen sich zeichnerisch oder photographisch festhalten. Das Photographieren erfolgte mit einem Laborator 138 S (Durst, Bozen) auf 9 x 12 Negativen (Agfa Gevaert P 43 p Gevatone pan) bei schrägem Durchlicht von unten gegen dunklen Untergrund.

3.3.2. Die Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese ermöglicht gegenüber der Geldifusion eine bessere Auftrennung komplexer Antigengemische.

Sie wurde von GRABAR und WILLIAMS (1953 u. 1955) entwickelt und von SCHEIDEGGER (1955) zu dem heute allgemein gebräuchlichen Objektträgerverfahren modifiziert (HIRSCHFELD, 1960 u. 1961; GILLERT, 1962; HEREMANS, 1963; GRABAR und BURTIN, 1964). Der entscheidende Vorzug dieser Methode liegt darin, daß man immunologisch identische, elektrophoretisch aber verschiedene Substanzen, z. B. die Transferrine des Liquors (CAWLEY, 1969), unterscheiden kann. Ebenso können elektrophoretisch einheitlich mobile, immunologisch aber verschiedene Substanzen differenziert werden, z. B. die α -2-Globuline des Serums (CAWLEY, 1969).

Als Auftrennungs- und Diffusionsmedien eignen sich Agar- oder Agarosegele, Zelluloseazetatmembranen oder Filterpapiere. Auch Mischgele aus Polyacrylamid und Agar oder Agarose und Kombinationsgele, z. B. von Stärke- und Agargel (POULIK, 1959) oder Polyacrylamid- und Agargel (EL SHARKAWY und HUISINGH, 1971), können verwendet werden. Der pH-Wert des Gels muß in einem Bereich liegen, in dem das zu untersuchende Protein löslich ist; gewöhnlich wurden Pufferlösungen von pH 7,4 bis pH 8,6 verwendet. Gleichzeitig darf die Ionenstärke des Puffers nicht zu hoch sein, um die Bildung von Joule'scher Wärme während der Elektrophorese in Grenzen zu halten. Die angegebenen Ionenstärken der Puffer lagen zwischen 0,01 und 0,1. Da die pH-Werte

der Puffer über dem isoelektrischen Punkt der Serumproteine liegen, verhalten sich diese wie Anionen und wandern bei der Elektrophorese zur Anode. Daneben gibt es noch eine ganze Reihe von Faktoren, die die Wanderung der Proteine beeinflussen. Neben den Bedingungen des Puffers und der elektrischen Feldstärke spielen die Porenweite des Gels, Adsorptionseffekte zwischen Gel und Protein und die Elektroendoosmose eine Rolle. Die Elektroendoosmose ist eine Wanderung der Ionen des Puffers zur Kathode. Stark geladene Gele, wie Agargel, erzeugen eine stärkere Endoosmose als schwach geladene, wie Agarosegel. Aus diesem Grund wandern bei der Elektrophorese im Agargel die schwach negativ geladenen Immunglobuline scheinbar zur Kathode.

Nach der Elektrophorese erfolgt die Diffusion des aufgetrennten Antigengemisches gegen das Antiserum senkrecht zur Richtung der Elektrophorese. Dieser Vorgang läuft nach den bei der Immundiffusion beschriebenen Prinzipien ab. Ausführliche theoretische und methodische Darstellungen über die Immunelektrophorese finden sich bei CROWLE (1961), GRABAR und BURTIN (1964), BACKHAUSZ (1967), OUCHTERLONY (1968) und CAWLEY (1969).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

immunelektrophoretischen Untersuchungen wurde die Immunelektrophoreseausrüstung LKB 6800 A (LKB Produkter AB, Stockholm) benutzt. Die technische Durchführung erfolgte mit Abwandlungen nach der von HIRSCHFELD (1960) beschriebenen Methode und nach den Vorschriften der Herstellerfirma:

a) Bereitung des Gels

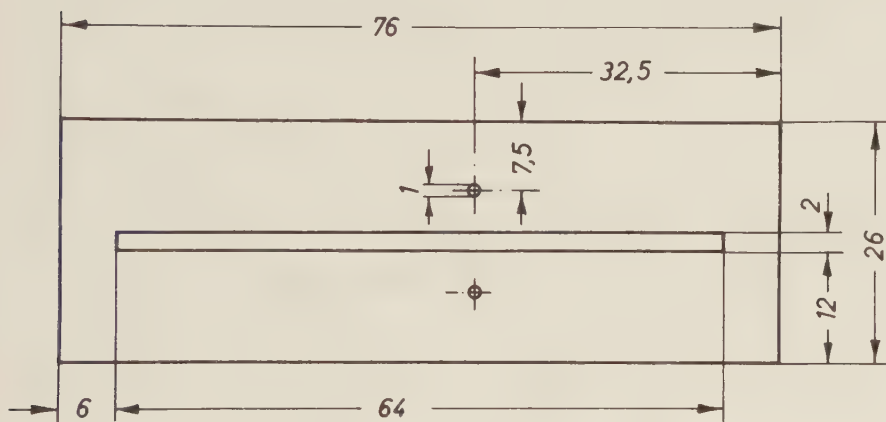
In Gelpuffer wurden 1 % Agar (Difco Special Agar Noble; Difco Lab., Detroit) im kochenden Wasserbad gelöst. Das Gel enthielt Merthiolat^R in einer Konzentration von 1 : 10 000.

b) Vorbereitung der Platten

Auf einem waagerecht justierten Nivelliertisch befanden sich drei Kunststoffrahmen, die je sechs fettfreie Objektträger (26 x 76 mm) enthielten. Auf diese Objektträger wurde eine auf 45° C abgekühlte Gellösung pipettiert, wobei jeweils 10 ml Gellösung für drei Objektträger eine Geldicke von etwa 1 mm ergeben. Die Gele wurden mindestens 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt.

c) Ausstanzen der Reagenzienbehälter

Die Reagenzienbehälter wurden mit einem LKB-Gelschneider vorgestanzt. Dabei entstand das in der Abb. 2 wieder-
gegebene Schnittmuster.



Maßstab 2:1

Abb. 2: Abdruck der Schablone für die Immunelektrophorese

Die in den Antigenbehältern befindlichen Agarstückchen wurden mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Kanüle entfernt.

d) Füllen der Reagenzienbehälter

Mit einer Konstriktionspipette wurden 3 μ l Testserum aufgetragen. Eine mit Bromphenolblau versetzte Probe markierte die Wanderung im elektrischen Feld. Unter den gegebenen elektrophoretischen Bedingungen wandert Bromphenolblau etwa doppelt so schnell wie Serumalbumin.

e) Durchführung der Elektrophorese

Zur Elektrophorese wurden die Gele durch Filterpapier mit dem Puffer in den Elektrodengefäßen verbunden. Die Auftrennung erfolgte zwei Stunden lang bei einer Spannung von 250 V und einem Gleichstrom von 50 mA.

f) Inkubation der Platten

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde der bereits vorgestanzte Antikörpergraben ausgehoben und etwa 100 μ l Antiserum eingefüllt. Die Platten wurden 24 Stunden lang bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert.

g) Färbung der Platten

Um das nicht präzipitierte Protein zu entfernen, wurden

die Platten 48 Stunden in physiologische Kochsalzlösung gelegt, die nach 24 Stunden erneuert wurde. Anschließendes Einlegen der Platten in destilliertes Wasser für eine Stunde entfernte das Kochsalz. Die Platten wurden mit feuchten Filterpapierstreifen bedeckt und im kalten Luftstrom eines Ventilators getrocknet. Nach Abnahme des Filterpapiers ließen sich die trockenen Platten nach einer im Anhang 2 (S. 98) angegebenen Vorschrift färben.

h) Registrierung der Ergebnisse

Die trockenen, gefärbten Platten konnten in verschließbaren Kästen aufbewahrt werden. Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Photographien wurden mit einem Laborator 138 S (Durst, Bozen) auf 9 x 12 Negativen (Agfa Gevaert P 43 p Gevatone pan) bei Durchlicht aufgenommen.

3.3.3. Die Immunelektroosmophorese

Das Prinzip der Immunelektroosmophorese (Gegenstromelektrophorese, Elektroimmundiffusion, Counter-current-Elektrophorese, Cross-over-Elektrophorese) besteht darin, daß bei bestimmten Pufferbedingungen die Immunglobuline infolge der Elektroendoosmose zur Kathode wandern. Handelt es sich bei diesen Immunglobulinen um präzipitierende Antikörper

gegen ein anodisch wanderndes Protein, so kommt es beim Zusammentreffen in der Zone der äquivalenten Konzentrationen zur Bildung eines Präzipitats. Dieses Verfahren wird in der klinischen Diagnostik, z. B. zum Nachweis des Australia-Antigens beim Menschen, eingesetzt (COMBRIDGE und SHAW, 1971; WALLIS und MELNICK, 1971). Gegenüber dem Ouchterlony-Test besitzt dieses Verfahren den Vorteil der Zeitersparnis und der höheren Empfindlichkeit (KOHN, 1970).

Diese Arbeit benutzt die von KOHN (1970) beschriebene Methode. Die Immunelektrosmophorese konnte mit der beschriebenen Immunelektrophorese-Apparatur durchgeführt werden. Die Auftrennung erfolgte in einem 1,25 %igen Agargel (Difco Special Agar Noble; Difco Lab., Detroit) mit Zusatz von Merthiolat^R 1 : 10 000. Die Behälter für Antigen und Antiserum waren wie in Abb. 3 dargestellt angeordnet.

Die Behälter wurden über einer gezeichneten Vorlage mit Hilfe eines Korkbohrers, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, ausgestanzt. In den kathodenseitigen Behälter wurden etwa 30 μ l Testserum eingefüllt. Dann erfolgte die Auftrennung des Testserums 40 Minuten lang bei einer Spannung von 200 V und einem Gleichstrom von 50 mA. Danach wurden in den anodenseitigen Behälter 30 μ l

Antiserum eingefüllt und die Auftrennung unter den gleichen Bedingungen solange fortgesetzt, bis ein Präzipitat bei einem positiven Kontrollserum erschien (nach etwa eineinhalb Stunden). Das Auswaschen des nicht präzipitierten Proteins sowie das Trocknen und Färben der Platten wurde in gleicher Weise wie bei der Immunelektrophorese durchgeführt.

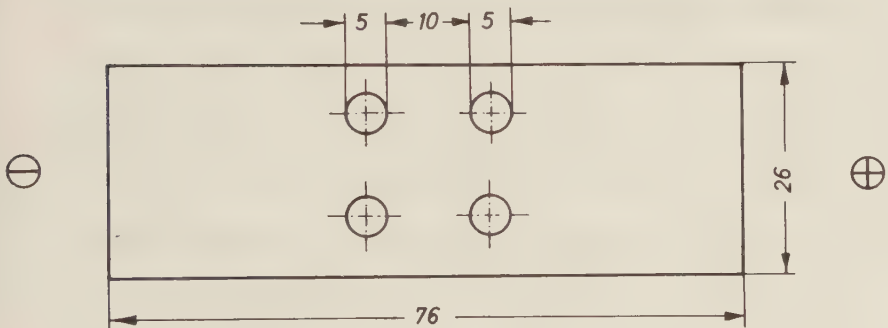


Abb. 3: Anordnung der Probenbehälter bei der
Immunelektrophorese

3.4. Der Nachweis von Proteinen, Lipoproteinen und
Enzymen im Serum

3.4.1. Die horizontale Stärkegelelektrophorese

Proteine, Lipoproteine und Enzyme des Serums wurden in dieser Arbeit auch mit Hilfe der von SMITHIES (1955 u. 1959) entwickelten horizontalen Stärkegelelektrophorese nachgewiesen. Dieses Verfahren wurde mit der von GELDERMANN (1969) entwickelten Apparatur durchgeführt. Für ca. 300 ml Stärkesuspension (hydrolysierte Stärke; Serva, Heidelberg) wurden 13 % Stärke in Gelpuffer (Anhang 1, S. 97) suspendiert. Die Suspension wurde im heißen Wasserbad solange gerührt, bis sie dickflüssig geworden war. Nach einer Erhitzungsdauer von weiteren 15 Minuten wurde der Stärkebrei dünnflüssiger und konnte mit einer Wasserstrahlpumpe entlüftet und in Glaströge (300 x 200 x 2 mm) blasenfrei ausgegossen werden. Die Verbindung zwischen Gel und dem Puffer in den Elektrodengefäßen bildeten Filterpapierstreifen. Der Probeneinsatz geschah mit 2 x 10 mm großen Filterpapierstückchen (Schleicher & Schüll, Dassel, Nr. 598), die mit der Serumprobe getränkt worden waren und in vorgeschchnittene Schlitze in das Gel eingesteckt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei einer Gleichspannung von 600 V und einem Strom von etwa 80 mA. Mit

Hilfe von Kühlplatten, die an einen Kryostat angeschlossen waren, wurde die Temperatur der Platten während der Auftrennung bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ gehalten. Unmittelbar nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Platten zur Darstellung von Proteinen, Lipoproteinen und Esterase-Isoenzymen gefärbt. Die photographische Registrierung der Ergebnisse erfolgte mit einem Laborator 138 S (Durst, Bozen) auf 9×12 Negativen (Agfa Gevaert P 43 p Gevatone pan) im Auflicht.

3.5. Die Isolierung von Lipoproteinen aus dem Serum

Polyanionen, wie z. B. sulfathaltige Polysaccharide, bilden molekulare Komplexe mit den high-density und low-density Lipoproteinen des Serums (TRIA und SCANU, 1969). Das in dieser Arbeit angewendete Verfahren zur Isolierung von Lipoproteinen wurde von KRITCHEVSKY et al. (1963) beschrieben. Zu 20 ml frischem Serum wurden 0,8 ml einer 5 %igen Lösung von Dextransulfat (Pharmacia, Uppsala) und 2 ml einer 11,1 %igen Kalziumchloridlösung gegeben. Nach 24-stündiger Lagerung bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ wurde die Mischung 15 Minuten lang bei 2 000 g zentrifugiert und der Überstand als " α -Lipoproteinlösung" abgefüllt. Das Sediment wurde in 20 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und mit 2 ml einer 12,7 %igen Kaliumoxalatlösung versetzt. Nach 24 Stunden Lagerung bei $+ 4^{\circ} \text{C}$ wurde erneut zentrifugiert

und der Überstand als " β -Lipoproteinlösung" gewonnen.
10 ml der β -Fraktion wurden mit Selecta-Ultrahülsen
Nr. 100 (Schleicher & Schüll, Dassel) auf 2 ml eingengt.

3.6. Statistische Methoden

Die Berechnung der Genfrequenzen erfolgte nach der
Quadratwurzelmethode (JOHANSSON et al., 1966):

$$q = \sqrt{\frac{z}{n}}$$

Dabei bedeuten:

q = die Frequenz des rezessiven Allels,

z = die Anzahl der rezessiv homozygoten Individuen und

n = die Gesamtzahl der untersuchten Individuen.

Zum Vergleich von Beobachtungs- und Erwartungswerten bei
den Segregationsdaten wurde der χ^2 -Test herangezogen.
Die Berechnung des χ^2 -Wertes erfolgte nach der Formel
(WEBER, 1967):

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^m \frac{(z_i - \varphi_i)^2}{\varphi_i}$$

Es bedeuten:

m = die Anzahl der Klassen,

z_i = die beobachtete Häufigkeit für das Eintreffen
des Ereignisses i und

y_i = die erwartete Häufigkeit für das Eintreffen
des Ereignisses i .

Für den Vergleich von Phänotypenhäufigkeiten und Gen-
frequenzen wurde der t-Test nach WEBER (1967) benutzt:

$$t = \frac{f_1 - f_2}{\sqrt{w_1 w_2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

Dabei sind:

$$w_1 = \frac{n_1 f_1 + n_2 f_2}{n_1 + n_2} ,$$

$$w_2 = 1 - w_1 ,$$

f_1 = die relative Häufigkeit des Ereignisses 1,

f_2 = die relative Häufigkeit des Ereignisses 2,

n_1 = die Anzahl der ersten Stichprobe und

n_2 = die Anzahl der zweiten Stichprobe.

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe spezieller Programme mit einem Kleincomputer digital lab 8/e (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.)⁺ durchgeführt.

4. Versuche und Ergebnisse

4.1. Methodische Arbeiten mit der Immunelektrophorese

Zur Entwicklung möglichst günstiger Versuchsbedingungen für die späteren immunelektrophoretischen Untersuchungen wurden eine Reihe von Pufferlösungen erprobt:

- a) Tris-Zitronensäure-Barbital-Puffer (KUBEK, 1970),
- b) Barbital-Barbital-Na-Kalziumlaktat-Puffer
(HIRSCHFELD, 1960),
- c) Phosphat-Puffer (CROWLE, 1961),
- d) Barbital-Natriumazetat-Puffer (CROWLE, 1961) und
- e) Barbital-Natriumazetat-Puffer (BACKHAUSZ, 1967).

(Die Bereitungsvorschriften sind in Anhang 1, S. 94, angegeben).

⁺) Das Gerät wurde dem Institut aus Mitteln der Stiftung Volkswagenwerk zur Verfügung gestellt.

Gleichzeitig wurde die Konzentration des Agargels verändert, wobei 1,5 %ige, 1,25 %ige und 1 %ige Gele verwendet wurden. Als Antigen diente stets Rinderserum, als Antikörper Anti-Rind-Serum vom Kaninchen, dessen Titer auf 1 : 32 eingestellt worden war. Tabelle 6 zeigt eine Zusammenstellung dieser methodischen Untersuchungen. Die Abb. 4 gibt die unter den verschiedenen Pufferbedingungen erzeugten Immunpheroogramme wieder. Das Puffersystem nach KUBEK (1970) mit einem 1 %igen Agargel erbrachte dabei die besten Auftrennungsergebnisse und wurde nachfolgend als Standardmethode für die weiteren Immunelektrophoresen benutzt.



Abb. 4: Der Einfluß verschiedener Puffer auf die
Immunelektrophorese

(Bezeichnungen nach den Angaben im Text, S. 58)

In einer anderen Versuchsreihe wurde bei Standardbedingungen ein Mischgel aus Polyacrylamid und Agar verwendet. 1 %iges Agargel enthielt 50 %, 60 % oder 70 % Acrylamid. Die Abb. 5 gibt den Vergleich von Immunpheroogrammen in Agargel und in einem Mischgel aus 50 % Agargel und 50 % Polyacrylamidgel wieder. Ein günstiger Einfluß des Acrylamidzusatzes auf das Auftrennungsergebnis konnte nicht beobachtet werden.

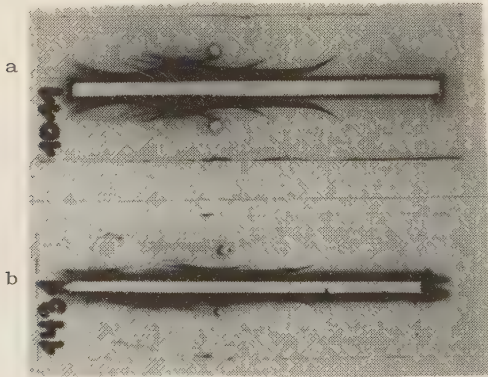


Abb. 5: Vergleich zweier Immunpheroogramme in Agargel (a) und in Agar-Polyacrylamidgel (b)

Tab. 6: Die Erprobung verschiedener Puffer und Gelkonzentrationen in der Immunelektrophorese

Puffer	Konz. d. Agargels (%)	Stromstärke ^{+) (mA)}	Feldstärke (V/cm)	Laufzeit (min)	Inkubationszeit (h)
Tris-Barbital-Na-Zitronensäure (KUBEK, 1970)	1,25	50	5,8	120	48
	1,25	50	5,8	120	24
	1,00	50	5,9	120	24
Barbital-Barbital-Na-Kalziumlaktat (HIRSCHFELD, 1961)	1,25	50	5,5	120	24
	1,00	50	5,4	120	24
Phosphat (CROWLE, 1961)	1,50	50	4,3	120	24
	1,00	50	5,4	120	24
Barbital-Natriumazetat (CROWLE, 1961)	1,00	50	6,1	120	24
Barbital-Natriumazetat (BACKHAUSZ, 1967)	1,00	50	5,5	120	24

^{+) Die Immunelektrophoresen wurden bei einer konstanten Versorgungsspannung von 250 V durchgeführt.}

4.2. Der Nachweis des Isoantigens

Zum Nachweis des Isoantigens während der Immunisierung und bei der Untersuchung des Familienmaterials wurde der Ouchterlony-Test eingesetzt. Alle Seren, in denen Isopräzipitine nachgewiesen wurden, bildeten bei der Diffusion gegen das zur Immunisierung verwendete Serum einen einzelnen, deutlichen Präzipitationsbogen. Ebenso wurde gegen die Seren aller anderen geprüften positiven Tiere ein einzelner Präzipitationsbogen ausgebildet.

Nach vier- bis fünfmonatiger Lagerung bei -25°C wurden die Isoantiseren in einem Wasserbad von 37°C aufgetaut. Dabei zeigte sich, daß von allen eingelagerten Seren nur noch im Serum Nr. 604 Isoantikörper im Ouchterlony-Test nachweisbar waren. Dieses Serum wurde als Isoantiserum für die folgenden Untersuchungen verwendet. Der Vergleich verschiedener positiver Seren im Ouchterlony-Test zeigte an den ineinander übergehenden Präzipitationsbögen, daß die Antigene in den reagierenden Seren identisch waren, wie in Abb. 6 zu sehen ist.

Die Ausbildung nur einer Präzipitationslinie deutete darauf hin, daß das Isoantiserum monospezifisch war. Zur

weiteren Absicherung dieser Annahme wurden 5 ml Antiserum mit dem gleichen Volumen eines positiven Serums einmal zehn Minuten und einmal dreißig Minuten bei Zimmertemperatur absorbiert. Anschließend wurden die Gemische zentrifugiert, um die Präzipitate abzutrennen. Der Überstand wurde im Ouchterlony-Test gegen eine Reihe positiver Seren auf das Vorhandensein nicht absorbierter Antikörper geprüft. Bereits eine zehnminütige Absorption genügte, um die Antigen-Antikörper-Reaktion vollständig zu hemmen. Das Isoantiserum wurde daher als monospezifisch betrachtet.

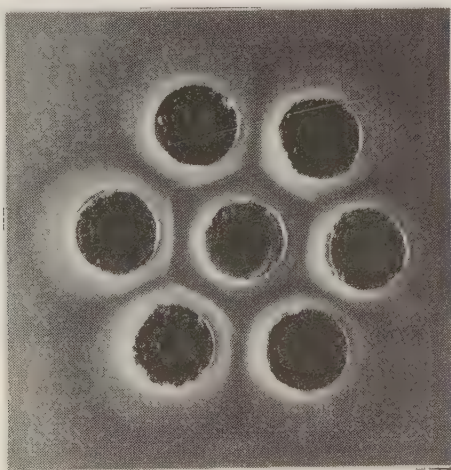


Abb. 6: Die Reaktion verschiedener Seren mit dem
Isoantiserum Nr. 604

Das im Ouchterlony-Test beobachtete Präzipitat konnte auch in der Immunelektroosmophorese dargestellt werden. Die erhaltenen Präzipitate waren bei dieser Methode deutlicher als im Ouchterlony-Test (Abb. 7). Sie färbten sich stark mit Proteinfarbstoff. Bei der Lipidfärbung konnte ebenfalls eine schwache Anfärbung beobachtet werden.

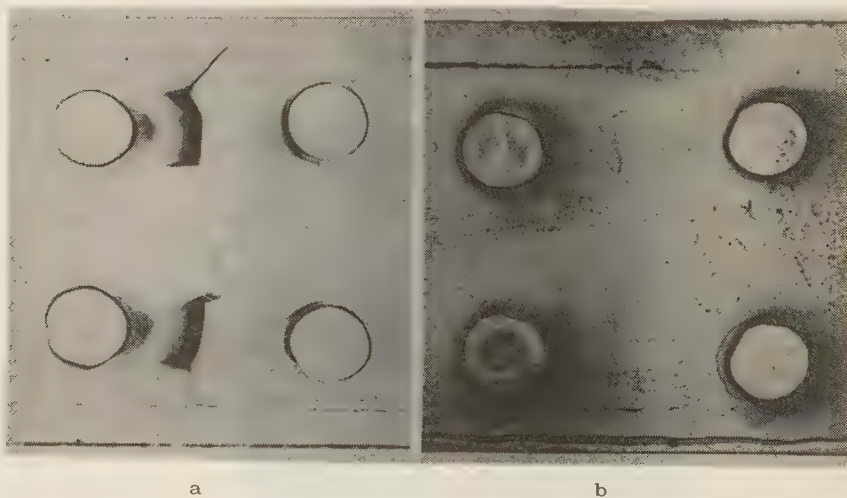


Abb. 7: Darstellung des Isoantigens in der Immunelektroosmophorese

a: Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250

b: Färbung mit Sudanschwarz B

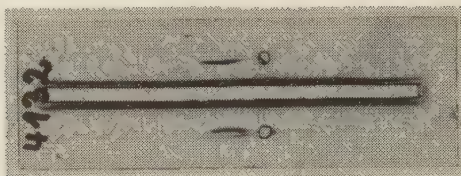
4.3. Die biochemische Beschreibung des Isoantigens

4.3.1. Physikochemische Eigenschaften

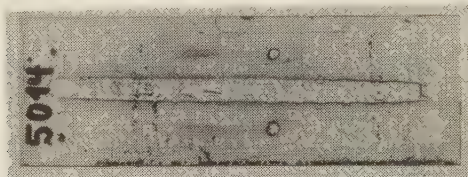
Die Stabilität des Isoantigens in vitro wurde durch thermische Einflüsse auf die Antigenaktivität geprüft. Positive Seren wurden bis zu fünfmal bei -34°C eingefroren und in einem Wasserbad von 40°C wieder aufgetaut. Die Reaktion mit dem Antiserum ließ sich dadurch nicht beeinflussen. Ebenso zeigte eine bis zu 60-minütige Inkubation der Testseren bei 56°C keinen Einfluß auf die Ergebnisse im Ouchterlony-Test. Die Lyophilisation des in der ersten Immunisierungsperiode verwendeten Mischserums führte hingegen zum Verlust der Antigenaktivität.

4.3.2. Immunelektrophoretische Untersuchungen

Bei der Auftrennung der Testseren in der Immunelektrophorese zeigte sich ein einzelner Präzipitationsbogen. Vergleichend mit den von JENSEN (1963) durchgeführten Auftrennungen von Normalseren wurde dieser Präzipitationsbogen als α -2-Globulin identifiziert. Das Präzipitat konnte mit Proteinfarbstoffen (z. B. Coomassie Brilliant Blue R 250), sowie mit dem Fettfarbstoff Sudanschwarz B angefärbt werden (Abb. 8). Damit lag der Schluß nahe, daß es sich bei dem Isoantigen um ein Lipoprotein handelt.



a: Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250



b: Färbung mit Sudanschwarz B

Abb. 8: Darstellung des Isoantigens in der
Immunelektrophorese

4.3.3. Immundiffusionsuntersuchungen mit isolierten Serumlipoproteinen

Um diese Annahme zu unterstützen, wurden Immundiffusionsuntersuchungen mit isolierten Lipoproteinen durchgeführt. Bei der Immundiffusion mit α -Lipoproteinen zeigten sich zwei Präzipitationslinien (Abb. 9). Der periphere Bogen war scharf gezeichnet, der innere Bogen dagegen breiter und unscharf. Bei Inkubation der Platten für länger als 48 Stunden verschwand dieser Bogen nahezu. Nach Immundiffusion mit β -Lipoproteinen entstand ein deutlicher Präzipitationsbogen, der dem peripheren Bogen bei den α -Lipoproteinen sehr ähnlich war. Somit war das Antigen

als Lipoprotein charakterisiert. Als Bezeichnung wird Lp-1 vorgeschlagen.

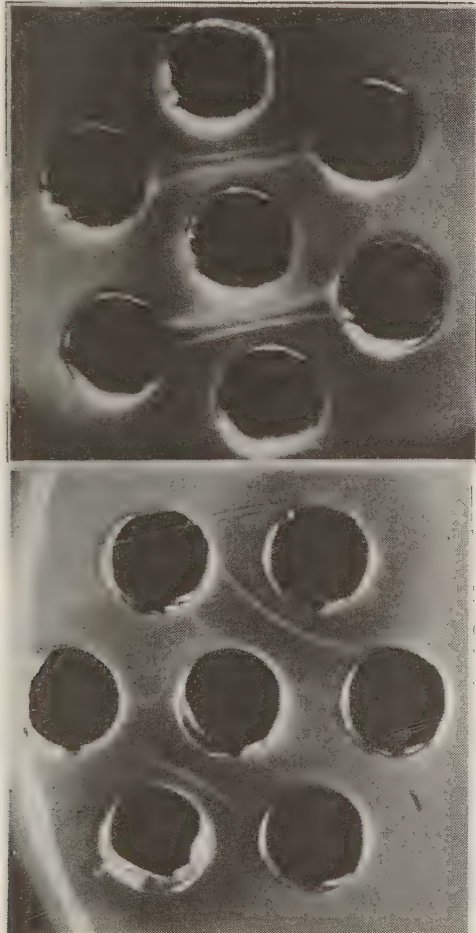


Abb. 9: Ouchterlony-Test mit α -Lipoproteinen (oben)
und mit β -Lipoproteinen (unten)
Der zentrale Behälter enthielt jeweils das
Isoantiserum

4.3.4. Untersuchungen an Gesamtspektren positiver und negativer Seren

In verschiedenen Untersuchungen sollte gezeigt werden, ob Unterschiede zwischen positiven und negativen Seren bestehen, die sich ohne Verwendung eines Isoantiserums darstellen lassen. Zu diesem Zweck wurden zunächst positive und negative Seren in der Immunelektrophorese gegen Anti-Rind-Serum vom Kaninchen getestet. Dabei zeigten sich identische Präzipitationsmuster (Abb. 10).

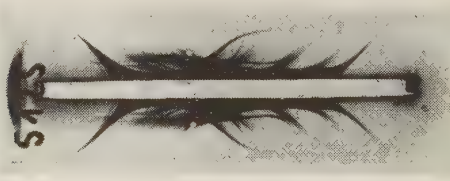
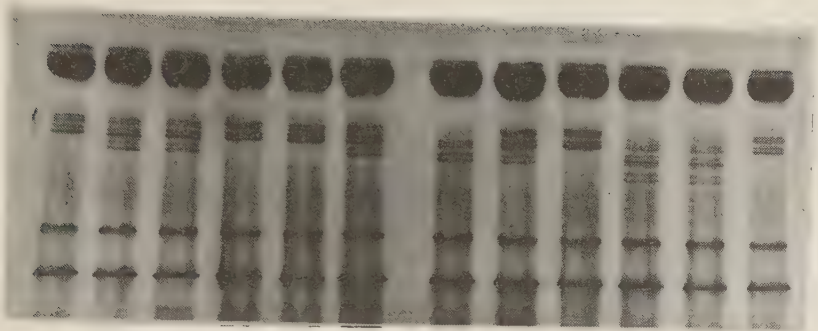


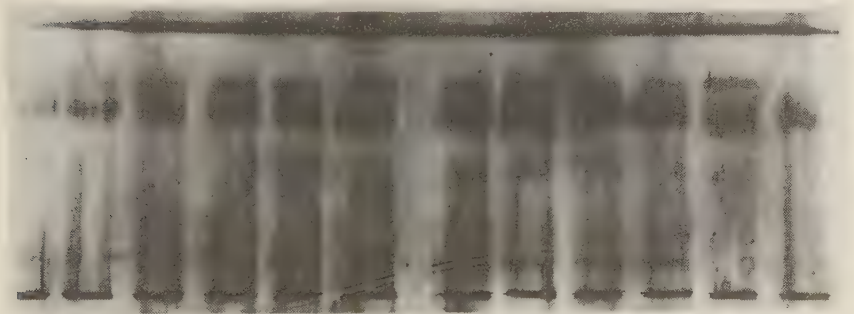
Abb. 10: Immunelektrophorese eines positiven Serums (oben) und eines negativen Serums (unten)

Im Antikörpergraben befand sich Anti-Rind-Serum vom Kaninchen

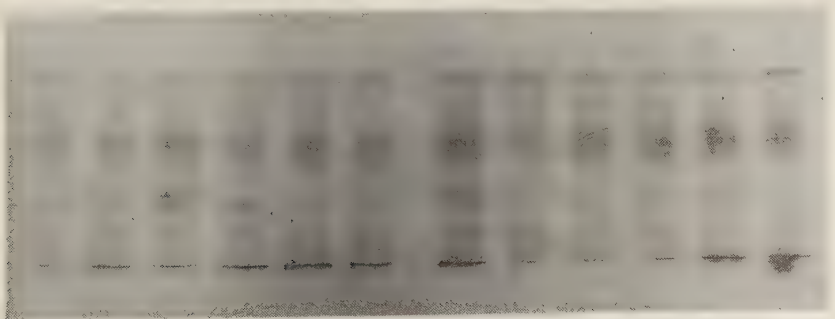
Die Untersuchung positiver und negativer Seren mit der horizontalen Stärkegelelektrophorese erbrachte bei Anfärbung der Proteine (Abb. 11 a) und Lipoproteine (Abb. 11 b) keine Unterschiede. Auch durch den Nachweis von Esterase-Isoenzymen ließen sich positive und negative Seren nicht unterscheiden (Abb. 11 c).



a) Färbung mit Amidoschwarz 10 B



b) Färbung mit Sudanschwarz B



c) Esterasenfärbung

Abb. 11: Horizontale Stärkegelelektrophorese positiver
und negativer Seren

Die ersten sechs Seren von links enthielten
Lp-1, während den übrigen das Antigen fehlte

4.3.5. Charakterisierung des Isopräzipitins

Zur Charakterisierung des Isopräzipitins wurde das Isoantiserum immunelektrophoretisch aufgetrennt. Die Diffusion erfolgte gegen unverdünntes positives Serum. Als Ergebnis zeigte sich ein einzelner Präzipitationsbogen im IgG-Bereich (Abb. 12).

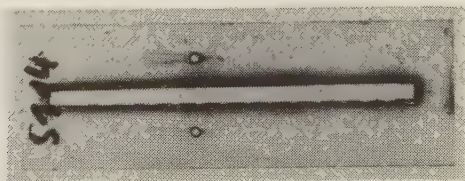


Abb. 12: Darstellung des Isoantikörpers in der
Immunelektrophorese

Der obere und der untere Behälter enthielten das Isoantiserum, im Antikörpergraben befand sich positives Serum

4.4. Die genetische Auswertung der Verteilung des Allotyps im Tiermaterial

Zur genetischen Beschreibung des Allotyps wurde seine Verteilung in dem in Tabelle 5 (S. 35) dargestellten Tiermaterial mit Hilfe des Ouchterlony-Tests untersucht.

Der Phänotyp von Allotyp-positiven Tieren wurde als Lp-1, der Allotyp-negativer Tiere als Lp-0 bezeichnet. Unter Zugrundelegung der Hypothese einer monogenen Kontrolle des Allotyps wurden die zugehörigen Allele als Lp¹ und Lp⁰ bezeichnet. Tabelle 7 zeigt die Verteilung der Phänotypen im untersuchten Tiermaterial.

Setzt man voraus, daß sich die untersuchte Population bezüglich des Allotyps Lp-1 im genetischen Gleichgewicht befindet, so lassen sich aus den Phänotypenhäufigkeiten mit Hilfe der Quadratwurzelmethode die Genfrequenzen errechnen. Bei Annahme einer dominanten Vererbung von Lp-1 ergeben sich die in Tabelle 8 dargestellten Genfrequenzen. Die für rezessive Vererbung von Lp-1 errechneten Genfrequenzen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 7: Beobachtete Verteilung der Phänotypen im untersuchten Tiermaterial (Sbt = Deutsche Schwarzbunte; Rbt = Deutsche Rotbunte; FlV = Deutsches Fleckvieh)

Rasse	Anzahl der Tiere n	Lp-1		Lp-0	
		abs.	rel.	abs.	rel.
Sbt insges.	693	457	0.660 ± 0,018	236	0.340 ± 0,018
Kühe	299	203	0.679 ± 0,027	96	0.321 ± 0,027
Bullen	73	44	0.603 ± 0,057	29	0.397 ± 0,057
Rbt	144	71	0.493 ± 0,047	73	0.507 ± 0,047
FlV (Bullen)	105	86	0.819 ± 0,038	19	0.181 ± 0,038

Tab. 8: Berechnung der Genfrequenzen bei Annahme einer dominanten Vererbung

Rasse	Anzahl der Tiere n	Genfrequenz von	
		Lp ¹ (dom.)	Lp ⁰ (rez.)
Sbt insges.	693	0.416 ± 0,019	0.584 ± 0,019
Kühe	299	0.433 ± 0,029	0.567 ± 0,029
Bullen	73	0.370 ± 0,057	0.630 ± 0,057
Rbt	144	0.288 ± 0,038	0.712 ± 0,038
FlV (Bullen)	105	0.575 ± 0,048	0.425 ± 0,048

Tab. 9: Berechnung der Genfrequenzen bei Annahme
einer rezessiven Vererbung

Rasse	Anzahl der Tiere n	Genfrequenz von	
		Lp ¹ (rez.)	Lp ⁰ (dom.)
Sbt insges.	693	0.812 ± 0,015	0.188 ± 0,015
Kühe	299	0.824 ± 0,022	0.176 ± 0,022
Bullen	73	0.776 ± 0,049	0.224 ± 0,049
Rbt	144	0.702 ± 0,038	0.298 ± 0,038
FlV (Bullen)	105	0.905 ± 0,029	0.095 ± 0,029

Aus den Genfrequenzen bei den Eltern lassen sich die für die verschiedenen Paarungskombinationen zu erwartenden Genotypfrequenzen der Nachkommen ermitteln. Die Formeln dazu werden in Tabelle 10 wiedergegeben. Für die hier vorgenommene Untersuchung des Allotyps standen als Tiermaterial nur Halbfamilien zur Verfügung, bei denen der Genotyp des Vaters nicht bekannt war. Tabelle 11 zeigt die Formeln zur Berechnung von Phänotypenhäufigkeiten der Nachkommen in Halbfamilien bei dominant-rezessivem Erbgang. Die Beobachtungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten der Nachkommen bei den Deutschen Schwarzbunten werden in

Tabelle 12 wiedergegeben. Diesen Beobachtungswerten wurden die Erwartungswerte für dominante und rezessive Vererbung des Allotyps gegenübergestellt (Tab. 13 und 14).

Die beim Deutschen Rotbunten beobachteten Phänotypen-häufigkeiten der Nachkommen sind in Tabelle 15 enthalten. Die entsprechenden Erwartungswerte für dominante und rezessive Vererbung des Allotyps werden in den Tabellen 16 und 17 wiedergegeben. Die Übereinstimmung zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten wurde mit dem χ^2 -Test geprüft (Tab. 18). Sowohl bei den Schwarzbunten, als auch bei den Rotbunten zeigten sich hochsignifikante ($P < 0,1 \%$) Abweichungen zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten bei Annahme einer rezessiven Vererbung. Dagegen stimmten die beobachteten und erwarteten Daten unter der Voraussetzung eines dominanten Erbgangs gut überein. Der Allotyp Lp-1 wird demnach als dominantes Merkmal vererbt.

Zur Prüfung auf X-chromosomale Vererbung des Allotyps wurde untersucht, ob unter den männlichen Nachkommen negativer Mütter Träger des Phänotyps Lp-1 vorkamen. Nimmt man an, daß der Locus Lp auf einem X-Chromosom liegt, so sind von Müttern des Phänotyps Lp-0 keine männlichen Merkmalsträger unter den Nachkommen zu erwarten. Unter

den männlichen Nachkommen von negativen Müttern der Rasse Deutsche Schwarzbunte konnten jedoch 31 männliche Tiere des Phänotyps Lp-1 beobachtet werden. Demnach handelt es sich bei Lp um einen autosomalen Genort.

Als nächstes wurden die Beobachtungs- und Erwartungswerte für die Häufigkeiten positiver und negativer Mütter verglichen (Tab. 19). Dabei konnte mit dem

χ^2 -Test keine signifikante Abweichung festgestellt werden.

Eine Gegenüberstellung der beobachteten und erwarteten Werte für die Häufigkeiten positiver und negativer Nachkommen bei Müttern des gleichen Phänotyps ergab ebenfalls eine Übereinstimmung, wie die Tabelle 20 zeigt. Dieser Vergleich verwendet Erwartungswerte (E), die wie folgt aus den Beobachtungswerten abgeleitet wurden:

$$E = \frac{E_1 B_g}{E_g} \quad \text{bzw.} \quad E = \frac{E_0 B_g}{E_g}$$

Es bedeuten:

E_1 : Erwartungswert für positive Nachkommen,

E_0 : Erwartungswert für negative Nachkommen,

E_g : Erwartungswert für die Gesamtzahl der Nachkommen

und B_g : Beobachtungswert für die Gesamtzahl der Nachkommen.

Tab. 10: Genotypfrequenz der Nachkommen bei den verschiedenen Paarungskombinationen der Eltern (nach FALCONER, 1970)

Genotypen der Eltern	Paarungs- häufigkeit	Verteilung der Nachkommen		
		A^1A^1	A^1A^0	A^0A^0
$A^1A^1 \times A^1A^1$	np^4	np^4		
$A^1A^1 \times A^1A^0$	$4np^3q$	$2np^3q$	$2np^3q$	
$A^1A^0 \times A^1A^0$	$4np^2q^2$	np^2q^2	$2np^2q^2$	np^2q^2
$A^1A^1 \times A^0A^0$	$2np^2q^2$		$2np^2q^2$	
$A^1A^0 \times A^0A^0$	$4npq^3$		$2npq^3$	$2npq^3$
$A^0A^0 \times A^0A^0$	nq^4			nq^4
Summe	n	np^2	$2npq$	nq^2

Tab. 11: Phänotypenhäufigkeiten der Nachkommen bei den verschiedenen Paarungskombinationen in Halbfamilien (Dominant-rezessiver Erbgang)

Phänotyp der Mutter	Genotyp der Mutter	Genotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeit	Nachkommen	
				$Lp-1$ Lp^1Lp^1 oder Lp^1Lp^0	$Lp-0$ Lp^0Lp^0
$Lp-1$	Lp^1Lp^1 oder Lp^1Lp^0	Lp^1Lp^1 Lp^1Lp^0 Lp^0Lp^0	$np(1 + q)$	$np(1 + pq)$	npq^2
$Lp-0$	Lp^0Lp^0	Lp^1Lp^1 Lp^1Lp^0 Lp^0Lp^0	nq^2	npq^2	nq^3
		Summe:	n	$np(1 + q)$	nq^2

Tab. 12: Beobachtungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen
Deutsche Schwarzbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeit	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1 Lp-0	203	157	46
Lp-0	Lp-1 Lp-0	93	36	57
	Summe:	296	193	103

Tab. 13: Erwartungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen bei Annahme einer dominanten
Vererbung des Allotyps
Deutsche Schwarzbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeit	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1 Lp-0	195,2	153,2	42,0
Lp-0	Lp-1 Lp-0	100,8	42,0	58,8
	Summe:	296	195,2	100,8

Tab. 14: Erwartungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen bei Annahme einer rezessiven
Vererbung des Allotyps
Deutsche Schwarzbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeit	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1	285,5	277,0	8,5
	Lp-0			
Lp-0	Lp-1	10,5	8,5	2,0
	Lp-0			
	Summe:	296,0	285,5	10,5

Tab. 15: Beobachtungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen
Deutsche Rotbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeiten	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1	36	25	11
	Lp-0			
Lp-0	Lp-1	33	10	23
	Lp-0			
	Summe:	69	35	34

Tab. 16: Erwartungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen bei Annahme einer dominanten
Vererbung des Allotyps
Deutsche Rotbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeiten	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1	34,0	23,9	10,1
	Lp-0			
Lp-0	Lp-1	35,0	10,1	24,9
	Lp-0			
	Summe:	69,0	34,0	35,0

Tab. 17: Erwartungswerte für die Phänotypenhäufigkeiten
der Nachkommen bei Annahme einer rezessiven
Vererbung des Allotyps
Deutsche Rotbunte

Phänotyp der Mutter	Phänotyp des Vaters	Paarungs- häufigkeiten	Nachkommen	
			Lp-1	Lp-0
Lp-1	Lp-1	62,9	58,6	4,3
	Lp-0			
Lp-0	Lp-1	6,1	4,3	1,8
	Lp-0			
	Summe:	69,0	62,9	6,1

Tab. 18: Vergleich zwischen den Beobachtungs- und Erwartungswerten der Phänotypen bei den Nachkommen

Rasse		Mutter Lp-1 Nachkommen		Mutter Lp-0 Nachkommen		χ^2	FG	P
		Lp-1	Lp-0	Lp-1	Lp-0			
Sbt	Beobachtungswerte	157	46	36	57			
	Erwartungswerte							
	Allot. dom.	153,2	42,0	42,0	58,8	1,39	3	n.s.
	Allot. rez.	277,0	8,5	8,5	2,0	>13,8	2	<0,1 %
Rbt	Beobachtungswerte	25	11	10	23			
	Erwartungswerte							
	Allot. dom.	24,0	10,1	10,1	24,9	0,27	3	n.s.
	Allot. rez.	58,6	4,3	4,3	1,8	>13,8	2	<0,1 %

Tab. 19: Vergleich zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten für die Häufigkeiten positiver und negativer Mütter

Rasse	Phänotyp der Mutter	Beobachtete Paarungshäufigkeit	Erwartete Paarungshäufigkeit	χ^2	FG	P
Sbt	Lp-1	203	195,2	0,92	1	n.s.
	Lp-0	93	100,8			
Rbt	Lp-1	36	34,0	0,23	1	n.s.
	Lp-0	33	35,0			

Tab. 20: Vergleich zwischen Beobachtungs- und Erwartungswerten für die Häufigkeiten positiver und negativer Nachkommen bei Müttern des gleichen Phänotyps

Rasse	Phänotyp der Mutter	Beobachtungswerte für Nachkommen		Erwartungswerte für Nachkommen		χ^2	FG	P
		Lp-1	Lp-0	Lp-1	Lp-0			
Sbt	Lp-1	157	46	159,3	43,7	0,15	1	n.s.
	Lp-0	36	57	38,8	54,2	0,35	1	n.s.
Rbt	Lp-1	25	11	25,3	10,7	0,01	1	n.s.
	Lp-0	10	23	9,5	23,5	0,04	1	n.s.

Außerdem wurden die relativen Häufigkeiten der Phänotypen bei Müttern und Nachkommen verglichen. Dazu wurde der t-Test benutzt. Der Anteil an Tieren mit dem Phänotyp Lp-1 war dabei sowohl bei den Müttern, als auch bei den Nachkommen gleich. Diese Übereinstimmung galt für Schwarzbunte und Rotbunte (Tab. 21).

Tab. 21: Vergleich der relativen Häufigkeiten der Phänotypen bei Müttern und Nachkommen

Rasse		Gesamtzahl	davon Lp-1	t-Wert	FG	P
Sbt	Mütter	296	203	0,87	590	n.s.
	Nachkommen	296	193			
Rbt	Mütter	69	36	0,17	136	n.s.
	Nachkommen	69	35			

Für die Schwarzbunten wurden darüber hinaus die Phänotypenhäufigkeiten und Genfrequenzen bei den Geschlechtern verglichen (Tab. 22). Eine signifikante Abweichung zwischen weiblichen und männlichen Tieren war nicht festzustellen. Dagegen erbrachten die Vergleiche von Phänotypenhäufigkeiten und Genfrequenzen zwischen den untersuchten Rassen signifikante Abweichungen. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 23 gezeigt. Der Vergleich der Genfrequenzen in den untersuchten Rassen wird in Abb. 13 graphisch dargestellt.

Tab. 22: Vergleich der Phänotypenhäufigkeiten und Genfrequenzen bei weiblichen und männlichen Tieren
Deutsche Schwarzbunte

Geschlecht	Anzahl der Tiere n	Phäno- typen- häufig- keit f	t	FG	P	Gen- frequenz p	t	FG	P
weiblich	299	0,679	1,24	370	n.s.	0,433	0,98	370	n.s.
männlich	73	0,603				0,370			

Tab. 23: Vergleich der Phänotypenhäufigkeiten und Genfrequenzen bei den untersuchten Rassen

Rasse	Anzahl der Tiere n	Phäno- typen- häufig- keit f	t	FG	P	Gen- frequenz p	t	FG	P
Sbt	693	0,660	3,77	835	<0,1 %	0,416	2,86	835	<1 %
Rbt	144	0,493				0,288			
Sbt	693	0,660	3,27	796	<1 %	0,416	3,06	796	<1 %
FlV	105	0,819				0,575			
Rbt	144	0,493	5,26	247	<0,1 %	0,288	4,55	247	<0,1 %
FlV	105	0,819				0,575			

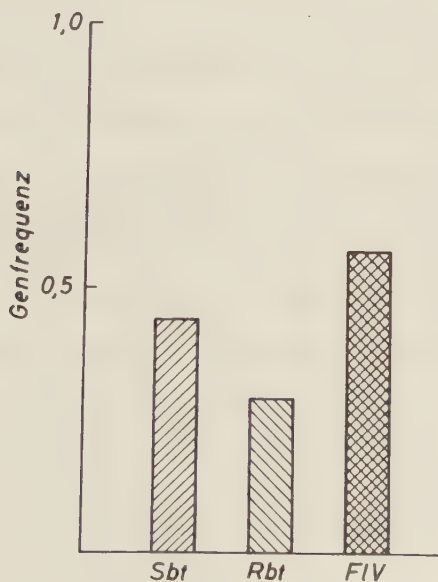


Abb. 13: Vergleich der Genfrequenzen von Lp-1 bei den untersuchten Rassen

5. Besprechung der Ergebnisse

Das Präzipitin, das im Serum der isoimmunisierten Kuh Nr. 604 nachweisbar war, konnte immunelektrophoretisch als Antikörper identifiziert werden. Das korrespondierende Antigen, ein Serumprotein, das in bestimmten Tieren der gleichen Spezies die Bildung von Antikörpern hervorruft, wird definitionsgemäß als Allotyp bezeichnet (DRAY et al., 1962). Die genetischen Untersuchungen bestätigen, daß es sich um ein Isoantigen handelt. Da nur Tiere mit dem Phänotyp Lp-1 oder Lp-0 beobachtet werden, das Merkmal also diskontinuierlich verteilt ist, liegt ein Polymorphismus vor.

Die Absorptionsversuche und Geldiffusionsuntersuchungen zeigen, daß es sich um eine einheitliche Spezifität handelt. Auf Grund der Lage des Präzipitats in der Immunelektrophorese und der Anfärbung mit einem lipophilen Farbstoff kann man annehmen, daß es sich um ein Lipoprotein handelt. Die Sudanschwarzfärbung ist jedoch kein sicheres Kriterium zur Charakterisierung von Lipoproteinen. Selbst gereinigte Lipoproteine lassen sich unter Umständen nicht mit Fettfarbstoffen anfärben (RAPACZ, 1972). Möglicherweise liegt der Hauptanteil der Lipidgruppen nicht auf

der Oberfläche der globulären oder ellipsoiden Lipoproteinmoleküle. Andererseits zeigt die verwendete Sudanschwarzfärbung (RESSLER et al., 1961; NARAYAN und KUMMEROW, 1966) bei den Seren, die in der Stärkegelelektrophorese aufgetrennt wurden, keine strenge Spezifität. Neben den s- α -2-Globulinen, unter denen auch Lipoproteine zu finden sind, färbten sich auch die Transferrine und Albumine (Abb. 11 b, S. 69).

Um die Frage, ob ein Lipoprotein vorliegt, besser beantworten zu können, wurden α - und β -Lipoproteine aus positiven Seren isoliert (KRITCHEVSKY et al., 1963) und gegen das Isoantiserum getestet. Diese Isolierungsmethode erlaubt keine Reindarstellung der Lipoproteinfraktionen, wie dies durch Ultrazentrifugation möglich ist. Die damit gewonnene α -Fraktion stellt kein reines high-density Lipoprotein dar, sondern ein Serum, aus dem der größte Teil der β -Lipoproteine entfernt ist. Da diese Fraktion sich nicht einengen ließ, kann angenommen werden, daß sie auch gelöstes Dextransulfat enthält. Die beobachtete Bildung von zwei Präzipitationslinien wäre demnach so zu erklären, daß die periphere Linie ein echtes Präzipitat aus Isoantikörper und noch in dieser Fraktion vorhandenem low-density Lipoprotein darstellt. Der zweite, instabile

Bogen entsteht durch einen reversiblen Komplex aus Lipoproteinen des Isoantiserums und Dextransulfat. Die gewonnene β -Fraktion enthielt Lipoproteine mit einer Dichte von weniger als 1,063 g/ml und war kaum durch andere Serumproteine verunreinigt. Mit dieser Fraktion ergab sich eine deutliche Präzipitationslinie, die weit stärker war als bei der Diffusion mit positivem Serum.

Faßt man alle diese Befunde zusammen, so kann mit genügender Sicherheit angenommen werden, daß es sich bei dem beschriebenen Allotyp um ein Lipoprotein handelt, das der Klasse der β -Lipoproteine angehört. Eine eingehendere Klärung konnte mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht erreicht werden und war von der Zielsetzung dieser Arbeit her nicht beabsichtigt.

Allotypen der Serumlipoproteine sind beim Menschen und bei einer großen Zahl von Tieren bekannt (s. Tab. 3, S. 14). Mit Ausnahme des Allotyps H1-1 beim Kaninchen (BERG et al., 1971) und eines noch nicht benannten allotypischen Lipoproteins beim Menschen (GALLANGO, 1971) handelt es sich dabei um β -Lipoproteine. Beim Rind beobachteten RAPACZ und HASLER (1968) zwei Allotypen bei den Serumlipoproteinen. Es handelt sich einmal um ein high-density Lipoprotein

mit einem Molekulargewicht von über 200 000, das bei weniger als 20 % der untersuchten Tiere auftrat und mit dem Isoantiserum eine mittelschwache Präzipitation zeigte. Im anderen Fall ist es ein nicht näher charakterisiertes Lipoprotein mit unbekannter Phänotyphäufigkeit und sehr schwacher Präzipitatbildung. Beide Allotypen wurden nicht genetisch untersucht.

Die genetische Untersuchung des in der vorliegenden Arbeit dargestellten Allotyps an einem Tiermaterial ergab, daß Lp-1 durch ein dominantes Allel eines autosomalen Genorts übertragen wird. Dieser Befund stimmt mit den bisher bekannten Allotypen bei den Haustieren überein, die ebenfalls durch dominante oder kodominante Allele autosomaler Loci übertragen werden. Aus den beobachteten Phänotypenhäufigkeiten in den untersuchten Populationen wurden unter Annahme eines genetischen Gleichgewichts, d. h. bei Fehlen von Mutation, Migration, Selektion und Zufallseinflüssen, die Genfrequenzen errechnet. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die Genfrequenz mit dem geschätzten Parameter (p) übereinstimmt. Mit Hilfe der errechneten Genfrequenzen war es möglich, die unter genetischen Gleichgewichtsbedingungen zu erwartende Segregation der Phänotypen im Familienmaterial zu ermitteln.

Ein Vergleich dieser erwarteten Segregationsdaten mit den in dem erfaßten Tiermaterial beobachteten ergab keine Abweichungen. Eine Übereinstimmung mit dem HARDY-WEINBERG-Gleichgewicht erbrachte auch der Vergleich der Paarungshäufigkeiten für positive und negative Mütter (Tab. 19, S. 80). Der Phänotyp der Mutter besitzt demnach keinen nachweisbaren Einfluß auf die Paarungshäufigkeit. Auch beim Vergleich der Phänotypenverteilung bei Nachkommen von Müttern des gleichen Phänotyps (Tab. 20, S. 81) und beim Vergleich der Phänotypenhäufigkeiten bei Müttern und Nachkommen (Tab. 21, S. 81) konnten keine Abweichungen vom genetischen Gleichgewicht gefunden werden. Soweit mit der beschränkten Tierzahl zu untersuchen war, beeinflußt also der Phänotyp eines Nachkommen seine Lebensfähigkeit nicht. Die Übereinstimmung der Genfrequenzen bei den untersuchten männlichen und weiblichen Tieren unterstützt ebenfalls die Annahme eines genetischen Gleichgewichts (FALCONER, 1970).

Die untersuchten Rinderrassen, Deutsche Schwarzbunte, Deutsche Rotbunte und Deutsches Fleckvieh, unterscheiden sich in der Phänotypenhäufigkeit und in der Genfrequenz des Allotyps Lp-1. Solche Rassenunterschiede sind auch bei anderen Allotypen des Rindes beschrieben, so z. B.

bei Mc-1 (RAPACZ et al., 1968), bei A-1 und bei B-1 (BLAKESLEE et al., 1971). Gleichgerichtete Unterschiede zeigen auch andere Polymorphismen des Rindes, wie die Transferrine, Postalbumine und Blutgruppenfaktoren (u. a. BUSCHMANN, 1963; BUSCHMANN und SCHMID, 1964; OSTERHOFF, 1966; GELDERMANN, 1970; KOVACZ et al., 1970; KIDD und SGARAMELLA-ZONTA, 1972). Beim Allotyp Lp-1 war die geringste Abweichung der Genfrequenzen zwischen Schwarzbunten und Rotbunten, die stärkste zwischen Rotbunten und Fleckvieh festzustellen. Dieser Befund stellt eine weitere Unterstützung der Annahme dar, daß die genetischen Beziehungen zwischen Schwarzbunten und Rotbunten untereinander stärker sind als zum Fleckvieh.

6. Zusammenfassung

Zur Gewinnung von Isoantikörpern wurden 16 schwarzbunte Kühe mit Rinderserum und Diäthylaminoäthyl-Dextran als Adjuvans immunisiert. Im Serum eines Tieres war ein für weitere Untersuchungen ausreichender Antikörper-Titer nachweisbar. Das korrespondierende, allotypspezifische Antigen wurde in der Immunelektrophorese als α -2-Globulin identifiziert. Die Sudanfärbung und Geldiffusionsuntersuchungen mit isolierten Serumlipoproteinen zeigten, daß es sich dabei um ein β -Lipoprotein handelte. Als Bezeichnung wurde daher Lp-1 vorgeschlagen. Positive und negative Seren ließen sich in der Immunelektrophorese nicht unterscheiden, wenn ein Anti-Rind-Serum verwendet wurde. Auch mit Hilfe der horizontalen Stärkegelelektrophorese bei verschiedenen Färbungen konnten die Lp-Phänotypen nicht dargestellt werden. Die Untersuchung eines Familienmaterials ergab, daß der Allotyp Lp-1 durch das dominante Allel Lp¹ eines autosomalen Genorts vererbt wird. Die Verteilung von Lp-1 in den untersuchten Populationen befand sich in Übereinstimmung mit dem genetischen Gleichgewicht. Die Genfrequenzen für Lp-1 bei den drei Rassen Deutsche Schwarzbunte, Deutsche Rotbunte und Deutsches Fleckvieh unterschieden sich signifikant voneinander.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein allotypischer Polymorphismus der β -Lipoproteine beim Rind beschrieben. Das angewendete Verfahren eignet sich sowohl zur Darstellung und Beschreibung weiterer Allotypen, wie auch zum routinemäßigen Nachweis des beschriebenen Allotyps.

Summary

Precipitating isoantisera were produced by isoimmunization of 16 cows of Deutsche Schwarzbunte with whole bovine serum and diethylaminoethyl-dextran as adjuvant. Only one serum contained antibody, sufficient for further experiments. The corresponding allotype-specific antigen was identified as α -2-globulin by immunoelectrophoresis. Staining with Sudan Black as well as gel diffusion experiments using isolated serum lipoproteins indicated that the allotype was a β -lipoprotein. Therefore Lp-1 was suggested for designation. When positive and negative sera were tested in immunoelectrophoresis against anti-bovine whole serum, identical reaction patterns were obtained. In addition, horizontal starch gel electrophoresis using a number of dyes did not reveal any difference between positive and negative sera. Genetic analysis demonstrated that Lp-1 is controlled by the dominant allele Lp¹ at an autosomal locus. The distribution of Lp-1 in the examined populations was shown to be in accordance with genetic equilibrium. Significant differences in gene-frequencies among the investigated breeds (Deutsche Schwarzbunte, Deutsche

Rotbunte, Deutsches Fleckvieh) were observed.

In this study, for the first time allotypic polymorphism of bovine β -lipoproteins has been reported. The methods used are appropriate for demonstration and genetic analysis of further allotypes as well as for routine allotyping.

7. Anhang 1: Bereitungsvorschriften für Pufferlösungen

a) Puffer für die Immunelektrophorese

Tris-Barbital-Na-Zitronensäure-Puffer, Gelpuffer

(KUBEK, 1970)

Tris	8,87 g
Barbital-Na	7,22 g
Zitronensäure	3,68 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
Mit 1 N HCl pH-Wert 8,2 einstellen	

Dieser Puffer wurde auch zur Bereitung des Gels für den Ouchterlony-Test benutzt.

Tris-Barbital-Zitronensäure-Puffer, Elektrodenpuffer

(KUBEK, 1970)

Tris	12,12 g
Barbital	8,66 g
Zitronensäure	4,41 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
Mit 1 N HCl pH-Wert 8,4 einstellen	

Barbital-Barbital-Na-Kalziumlaktat-Puffer (HIRSCHFELD, 1960)

	<u>Gelpuffer</u>	<u>Elektrodenpuffer</u>
Barbital	1,66 g	1,38 g
Barbital-Na	10,51 g	8,76 g
Kalziumlaktat	1,54 g	0,38 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml	zu 1000 ml
pH-Wert	8,6	8,6

Phosphat-Puffer (CROWLE, 1961)

Für Gel und Elektrodengefäße

Di-Natrium-hydrogenphosphat	6,40 g
Natrium-dihydrogenphosphat	1,30 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert	7,4

Barbital-Na-Natriumazetat-Puffer (CROWLE, 1961)

Für Gel und Elektrodengefäße

Barbital-Na	5,40 g
Natriumazetat	4,30 g
0,1 N HCl	58,20 ml
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert	8,6

Barbital-Na-Natriumazetat-Puffer (BACKHAUSZ, 1967)

Für Gel und Elektrodengefäße

Barbital-Na	9,75 g
Natriumazetat	6,47 g
0,1 N HCl	60,00 ml
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert 8,6	

b) Puffer für die Immunelektroosmophorese

Barbital-Na-Puffer, Gelpuffer (KOHN, 1970)

Barbital-Na	11,07 g
1 N HCl	16,04 ml
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert 8,2	

Barbital-Barbital-Na-Puffer, Elektrodenpuffer (CAWLEY, 1969)

Barbital	1,84 g
Barbital-Na	10,30 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert 8,6	

c) Puffer für die horizontale Stärkegelelektrophorese

Tris-Zitronensäure-Puffer, Gelpuffer (GELDERMANN, 1972 b)

Tris	2,20 g
Zitronensäure	1,21 g
Borsäure	0,47 g
Lithiumhydroxid	0,03 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert 6,7	

Borsäure-Puffer, Elektrodenpuffer (GELDERMANN, 1972 b)

Borsäure	18,50 g
Natriumhydroxid	1,74 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert 8,7	

8. Anhang 2: Färbemethoden

a) Färbungen für die Immunelektrophorese

Amidoschwarz-Nigrosin-Färbung für Proteine

Amidoschwarz 10 B	1,0 g
Nigrosin, alkohollöslich	0,5 g
Methanol	700 ml
Eisessig	200 ml
Dest. Wasser	100 ml

Färbedauer: 60 Minuten

Das Auswaschen der überschüssigen Farbe erfolgt in etwa fünf Bädern mit dem Lösungsmittelgemisch für die Farblösung.

Coomassie Blue-Färbung für Proteine

Coomassie Brilliant Blue R 250

(Serva, Heidelberg)	5,0 g
Methanol	450 ml
Eisessig	100 ml
Dest. Wasser	450 ml

Färbedauer: 60 Minuten

Das Auswaschen der überschüssigen Farbe erfolgt in etwa fünf Bädern mit dem Lösungsmittelgemisch für die Farblösung.

Sudanschwarzfärbung für Lipoproteine (BACKHAUSZ, 1967)

Sudanschwarz B	0,25 g
Äthanol	250 ml

Der Ansatz wird 24 Stunden lang bei 37° C unter gelegentlichem Schütteln aufbewahrt. Dann wird er auf 20° C abgekühlt, filtriert und die Lösung in einer braunen Flasche gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch werden pro 50 ml Farblösung 100 μ l einer 25 %igen Natronlauge zugesetzt. Färbedauer: 24 Stunden

Das Auswaschen der überschüssigen Farbe erfolgt in drei Bädern mit 50 %igem Methanol.

b) Färbungen für die horizontale Stärkegelelektrophorese

Amidoschwarz-Nigrosinfärbung für Proteine

Lösung 1:

Amidoschwarz 10 B	5,0 g
Methanol	250 ml
Eisessig	50 ml
Dest. Wasser	200 ml

Lösung 2:

Nigrosin, alkohollöslich	2,0 g
Methanol	125 ml
Eisessig	25 ml
Dest. Wasser	100 ml

Beide Ansätze werden 24 Stunden gelöst und dann gemischt. Die Gelplatten werden unmittelbar nach der Elektrophorese mit Farblösung überschichtet und in einer Lösung von Methanol-Wasser-Eisessig im Volumenverhältnis 5 : 4 : 1 entfärbt.

Sudanschwarzfärbung für Lipoproteine nach RESSLER et al.
(1961)

Ein Volumenanteil einer gesättigten Lösung von Sudanschwarz B in Äthylenglykol und zwei Volumenanteile Plasma oder Serum werden zusammen bei 4° C 24 Stunden lang inkubiert. Da der lipophile Farbstoff von den Lipidgruppen gebunden wird und überschüssiger Farbstoff bei der Elektrophorese am Start bleibt, sind die Lipoproteine nach der Auftrennung direkt sichtbar.

Gegenfärbung und Fixierung (NARAYAN und KUMMEROW, 1966)

Jod, doppelt sublimiert	0,75 g
Eisessig	75 ml
Dest. Wasser	zu 1000 ml

Der Ansatz wird filtriert und die Lösung in braunen Flaschen aufbewahrt. Die Gele werden mit der Farblösung bedeckt.

Färbung für Esterase-Isoenzyme

Lösung 1: Tris-Maleat-Puffer

Tris	24,2 g
Maleinsäure	23,2 g
Natriumhydroxid	6,4 g
Dest. Wasser	zu 1000 ml
pH-Wert	6,35

Lösung 2:

α -Naphthylazetat	0,25 g
Methanol p. A.	12,50 ml

Lösung 3:

Tris-Maleat-Puffer	100 ml
Methanol	100 ml

Die Lösungen 2 und 3 sind vor jeder Färbung frisch anzusetzen. 100 ml von Lösung 3 werden über die Gelplatte gegossen. Die anderen 100 ml werden der Lösung 2 zugefügt. Darin wird eine Spatelspitze (etwa 50 mg) Fast Garnet GBC Salt (diazotiertes o-Amino-azotoluol-Zinkchlorid; Serva, Heidelberg) gelöst. Diese Lösung wird ebenfalls über das Gel gegossen, daß die ganze Platte davon bedeckt ist. Nach etwa zweistündiger Inkubation bei Zimmertemperatur sind die Esterasezonen sichtbar.

9. Literaturverzeichnis

Albers, J. J., und S. Dray (1968):

Identification and genetic control of two
rabbit low density lipoprotein allotypes
Biochem. Genet. 2, 25 - 35

- -

(1969):

Identification and genetic control of two
new low density lipoprotein allotypes:
phenogroups at the Lpq locus
J. Immunol. 103, 155 - 162

Allison, A. C., und B. S. Blumberg (1961):

An isoprecipitation reaction distinguishing
human serum protein types
Lancet I, 176

Armerding, D. (1971):

Two allotypic specificities of rat
immunoglobulin
Eur. J. Immunol. 1, 39 - 45

Ashton, G. C. (1958):

Lack of "slow- α " proteins in some Guernsey
cattle
Nature 182, 193 - 194

-

(1972):

Serum post-albumins and fertility in dairy
cattle
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 8)

Backhausz, R. (1967):

Immunodiffusion und Immunelektrophorese
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- Backhausz, R. (1970):
Polymorphisms in human serum proteins
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 29 - 40
- Barabas, A. Z., und A. S. Kelus (1967):
Allotypic specificity of serum protein in
inbred strains of rats
Nature 215, 155 - 156
- Bash, J. A., und F. Milgrom (1972):
Studies on allotypes in sheep
Int. Arch. Allergy 42, 196 - 214
- Benacerraf, B., und P. G. H. Gell (1961):
Delayed hypersensitivity to homologous
 γ -globulin in the guinea pig
Nature 189, 586 - 587
- und H. O. McDevitt (1972):
Histocompatibility-linked immune response genes
Science 175, 273 - 279
- Berg, K. (1963):
A new serum type in man - the Lp system
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 59, 369 - 382
- (1965):
A new serum type in man. The Ld system
Vox Sang. 10, 513
- und G. Bearn (1966):
An inherited X-linked serum system in man -
the Xm system
J. exp. Med. 123, 379
- H. Boman, H. Torsvik und S. M. Walker (1971):
Allotypy of high density lipoprotein of
rabbit serum
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 905 - 908

- Berne, B. H., S. Dray und K. L. Knight (1971):
Immunological relationships of serum
 α -macroglobulins in the human, rat and rabbit
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 531 - 535
- Biozzi, G., R. Asofsky, R. Lieberman, C. Stiffel,
D. Mouton und B. Benacerraf (1970):
Serum concentrations and allotypes of
immunoglobulins in two lines of mice
genetically selected for "high" and "low"
antibody synthesis
J. exp. Med. 132, 752 - 764
- Blakeslee, D. (1970):
Ph. D. Thesis, University of Wisconsin
- J. E. Butler und W. H. Stone (1971):
Serum antigens of cattle
III. Immunogenetics of two immunoglobulin
allotypes
J. Immunol. 107, 227 - 235
- Bluestein, H. G., L. Ellman, I. Green und B. Benacerraf
(1971 a):
Specific immune response genes of the guinea
pig
III. Linkage of the GA and GT immune response
genes to histocompatibility genotypes in
inbred guinea pigs
J. exp. Med. 134, 1529 - 1537
- I. Green und B. Benacerraf (1971 b):
Specific immune response genes of the guinea
pig
IV. Demonstration in random-bred guinea pigs
that responsiveness to a copolymer of
L-glutamic acid and L-tyrosine is predicated
upon the possession of a distinct strain
13 histocompatibility specificity
J. exp. Med. 134, 1538 - 1544

Briles, W. E. (1954):

Evidence for overdominance of the B blood
group alleles in the chicken
Genetics 39, 961 - 962

- (1964):

Current status of blood groups in domestic
birds
Z. Tierzücht. Züchtbiol. 79, 371 - 391

- und R. W. Briles (1972):

Association of three chicken blood group
loci with viruses
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 10)

Bütler, R., und E. Brunner (1970):

A new interpretation of the serum factor Ag(e)
Vox Sang. 18, 370 - 372

- - N. Scaloumbacas, E. Politis, G. Morganti und
A. Vierucci (1970):

Ag(d), a further factor of the Ag system
Vox Sang. 18, 90 - 94

Bundschuh, G. (1966):

"Xh" - ein genetisch determiniertes
 α -2-Globulin
Acta biol. med. german. 17, 349 - 352

Buschmann, H. (1963):

Blutgruppengenetische Untersuchungen an
süddeutschen Rinderrassen
Z. Tierzücht. Züchtbiol. 78, 12 - 25

- und D. O. Schmid (1964):

Untersuchungen über den genetischen Serum-
transferrin- und Hämoglobinpolyorphismus
deutscher Rinderrassen
Zbl. Vet. Med. A, 11, 235 - 243

- Buschmann, H., und D. O. Schmid (1968):
Serumgruppen bei Tieren
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- Carr, W. R., R. L. Spooner und B. Woolf (1972):
The relationship between blood groups,
biochemical polymorphism and parasitic
diseases in Angoni cattle
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta, S. 100)
- Cawley, L. P. (1969):
Electrophoresis and immunoelectrophoresis
Little, Brown and Company, Boston
- Chiao, J. W., und S. Dray (1969):
Identification and genetic control of
rabbit haptoglobulin allotypes
Biochem. Genet. 2, 1 - 13
- Cinader, B., und S. Dubiski (1963):
An α -globulin allotype in the mouse (MuB-1)
Nature 200, 781
- Colberg, J. E., und S. Dray (1963):
Cellular studies of rabbit γ -globulin
allotypes
Fed. Proc. 22, 380
- - (1964):
Localization by immunofluorescence of
 γ -globulin allotypes in lymph node cells
of homozygous and heterozygous rabbits
Immunology 7, 273 - 290
- Combridge, B. S., und C. Shaw (1971):
Immunoelectroosmophoresis using discontinuous
buffer system to detect Australia antigen
in pooled human plasma
Lancet II, 1184 - 1185

Conway, T. P., E. A. Lichter und S. Dray (1968):

Allotype in rabbit γ -A-immunoglobulins
Fed. Proc. 27, 618

- S. Dray und E. A. Lichter (1969 a):

Identification and genetic control of three
rabbit γ -A-immunoglobulin allotypes
J. Immunol. 102, 544 - 554

- - - (1969 b):

Identification and genetic control of the
f-4 and f-5 rabbit γ -A-immunoglobulin
allotypes - phenogroups at the f locus
J. Immunol. 103, 662 - 667

Crowle, A. J. (1961):

Immunodiffusion
Academic Press, New York, London

Cumley, R. W., und M. R. Irwin (1940):

Differentiation of sera of two species of
doves and their hybrid
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 44, 353 - 355

- - und L. J. Cole (1941):

Genic effects on serum proteins
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 27, 565 - 570

- - (1942):

Immunogenetic studies of species: segregation
of serum components in backcross individuals
Genetics 27, 177 - 192

- - (1943):

Individual specificity of human serum
J. Immunol. 46, 63 - 70

Curtain, C. C. (1971):

Allotypes of serum α -2-macroglobulin,
 β -lipoprotein and immunoglobulins in the
domesticated sheep (*Ovis aries*)
Vox Sang. 21, 372 - 383

David, C. S., M. L. Kaeberle und A. W. Nordskog (1969):
Genetic control of immunoglobulin allotypes
in the fowl

Biochem. Genet. 3, 197 - 206

- und O. J. Fletcher (1971):

Serum allotype loss due to a lymphoid tumor
in chickens

J. Immunol. 106, 1673 - 1676

Davie, J. M., W. E. Paul, R. G. Mage und M. B. Goldmann
(1971):

Membrane associated immunoglobulins of rabbit
peripheral blood lymphocytes: allelic
exclusion at the b locus

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 430 - 434

Dickersen, R. E., und J. Geis (1969):

The structure and action of proteins
Harper and Row Publishers, New York

Dray, S. (1962):

Effect of maternal isoantibodies on the
quantitative expression of two allelic genes
controlling γ -globulin allotypic specificities
Nature 195, 677 - 680

- A. S. Kelus, S. Dubiski, E. S. Lennox und
J. Oudin (1962):

A notation for allotypy
Nature 195, 785 - 786

- Dray, S., R. Lieberman und H. A. Hoffman (1963):
Two murine γ -globulin allotypic specificities
identified by ascitic fluid isoprecipitins
and determined by allelic genes
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113, 509 - 513
- M. Potter und R. Lieberman (1965):
Immunochemical and genetic studies of two
distinct γ -G-immunoglobulins in BALB/c mice
J. Immunol. 95, 823 - 833
- Dubiski, S., und B. Cinader (1963):
A new allotypic specificity in the mouse
(MuA-2)
Can. J. Biochem. Physiol. 41, 1311 - 1315
- und P. J. Muller (1967):
A "new" allotypic specificity (A-9) of
rabbit immunoglobulin
Nature 214, 696 - 697
- (1969):
Immunochemistry and genetics of a new
"allotypic" specificity Ae¹⁴ of rabbit
 γ -G-immunoglobulin
J. Immunol. 103, 120 - 128
- (1970):
Does antibody synthesis involve somatic
recombination?
Protides Biol. Fluids 17, 117 - 124
- (1972):
Genetics and regulation of immunoglobulin
allotypes
Med. Clin. N. Amer. 56, 557 - 575

Edelman, G. M., und J. A. Gally (1964):

A model for the γ S antibody molecule
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 51, 846 - 853

El-Sharkawy, T. A., und D. Huisinigh (1971):

Improved method for immunoelectrophoretic
research
Infec. Immun. 2, 711

Fagerhol, M. K. (1968):

The Pi system
Ser. haematol. 1, 153 - 161

- und T. Gedde-Dahl jr. (1969):
Genetics of the Pi serum types
Hum. Hered. 19, 354 - 359

Falconer, D. S. (1970):

Introduction to quantitative genetics
Oliver and Boyd, Edinburgh

Feinstein, A. (1963):

Character and allotypy of an immune globulin
in rabbit colostrum
Nature 199, 1197 - 1199

- P. G. H. Gell und A. S. Kelus (1963):
Immunochemical analysis of rabbit γ -globulin
allotypes
Nature 200, 653

Fincham, J. R. S. (1972):

Heterozygous advantage as a likely general
basis for enzyme polymorphisms
Heredity 28, 387 - 391

Fisher, R. A. (1930):

The genetical theory of natural selection
University Press, Oxford

- Fleischman, J. B., R. R. Porter und E. M. Press (1963):
The arrangement of peptide chains in
 γ -globulin
Biochem. J. 88, 220 - 227
- Florent, G., C. Hamers-Casterman, J. Roefs-Grippa,
W. van der Loo und R. Hamers (1970):
A study of rabbit heavy chain allotypes
Protides Biol. Fluids 17, 147 - 150
- Ford, E. B. (1945):
Polymorphism
Biol. Rev. 20, 73 - 88
- (1966):
Genetic polymorphism
Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser. B 164, 350 - 361
- Frangione, B., E. C. Franklin und A. S. Kelus (1968):
L-chain peptide maps of rabbit IgG of
different allotypes
Immunology 15, 599 - 607
- Gahne, B. (1964):
Isoantibodies against slow α -2-globulin
in cattle
Hereditas 51, 375 - 378
- Gallango, M. L. (1971):
Precipitating antigen-antibody system of
high density lipoproteins
Nature 234, 111 - 112
- Gasparski, J. M., und R. W. C. Stevens (1970):
 γ -globulin allotypic specificities in
turkeys (*Melleagris gallopavo*)
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 513 - 515

Geldermann, H. (1969):

Darstellung und Beschreibung des Transferrin-
und Postalbuminpolymorphismus bei einigen
deutschen Rinderrassen
Inaug. Diss., Göttingen

- (1970):

Discriminant function as a method of comparison
between animal populations using blood groups
and protein variations
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 89 - 94

- (1971 u. 1972 a):

Molekulargenetische Probleme in der
tierzüchterischen Forschung und Praxis
Aufsatzreihe in: Tierzüchter 23 und 24

- (1972 b):

nicht veröffentlichte Ergebnisse

Gell, P. G. H., und A. S. Kelus (1962):

Deletions of allotypic γ -globulins in
antibodies
Nature 195, 44 - 45

- - (1964):

Anti-antibody or clone product?
Nature 201, 687 - 689

Gillert, K.-E. (1962):

Die Immunelektrophorese als diagnostische
Methode
Dtsch. med. J. 13, 687 - 689

- Gilman-Sachs, A., R. Mage, G. O. Young, C. Alexander
und S. Dray (1969):
Identification and genetic control of two
rabbit immunoglobulin allotypes at a second
light chain locus, the c locus
J. Immunol. 103, 1159 - 1167
- Gilmour, D. G. (1960):
Blood groups in chickens
Brit. Poultry Sci. 1, 75 - 100
- Grabar, P., und C. A. Williams (1953):
Méthode permettant l'étude conjuguée des
propriétés électrophorétiques et immuno-
chimiques d'un mélange de protéines
Application au sérum sanguin
Biochim. Biophys. Acta 10, 193 - 194
- - (1955):
Méthode immuno-électrophorétique d'analyse
de mélanges de substances antigéniques
Biochim. Biophys. Acta 17, 67 - 74
- und P. Burtin (1964):
Immuno-elektrophoretische Analyse
Elsevier Publishing Company, Amsterdam,
London, New York
- Greaves, M. F. (1971):
The expression of immunoglobulin determinants
on the surface of antigen binding lymphoid
cells in mice
Eur. J. Immunol. 1, 186 - 201
- Grubb, R. (1970):
The genetic markers of human immunoglobulins
Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics
Vol. 9, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York

- Günther, E., E. Rüdé und O. Stark (1972):
Antibody response in rats to the synthetic
polypeptide (T,G)-A--L genetically linked
to the major histocompatibility system
Eur. J. Immunol. 2, 151 - 155
- Gutman, G. A., und I. L. Weissman (1971):
Inheritance and strain distribution of a rat
immunoglobulin allotype
J. Immunol. 107, 1390 - 1393
- Hadarag, E., und I. Bercea (1972):
Polymorphism of aldolase in hens with leukosis
Rev. roum. Biochim. 9, 135 - 142
- Hamers, R., und C. Hamers-Casterman (1965):
Molecular localization of H-chain allotypic
specificities in rabbit IgG
J. molec. Biol. 14, 288 - 289
- C. Hamers-Casterman und S. Lagnaux (1966):
A new allotype in the rabbit linked with As-1
which may characterize a new class of IgG
Immunology 10, 399 - 408
- Harboe, M. D., C. K. Osterland, M. Mannik und H. G. Kunkel
(1962):
Genetic characters of human γ -globulins in
myeloma proteins
J. exp. Med. 116, 719 - 738
- Harrington, J. T., und W. D. Terry (1968):
Allotypic variability and C-terminal amino
acid sequence of IgG heavy chains
Fed. Proc. 28, 435

Heremans, J. F. (1963):

Die Immunelektrophorese und ihre klinische
Anwendung

Ergebn. Inn. Med. Kinderhk. 20, 169 - 257

Herzenberg, L. A. (1964):

A chromosome region for γ -2A and β -2A
globulin H-chain isoantigens in the mouse
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 29,
455 - 462

- N. L. Warner und L. A. Herzenberg (1965):
Immunoglobulin isoantigens (allotypes) in
the mouse
J. exp. Med. 121, 415 - 438

Hilschmann, N., H. U. Barnikol, M. Hess, B. Langer,
H. Ponstingl, M. Steinmetz-Kayne, L. Suter
und S. Watanabe (1969):

Structural studies on immunoglobulins and
their genetic implications for antibody
formation

FEBS-Symposium 15, 57 - 74

in: γ -globulin - its structure and
biosynthesis

Academic Press, Inc., London

- H. Ponstingl, J. Schwarz, W. Reichel,
K. Baczko, D. Braun, M. Hess, S. Watanabe,
L. Suter und H. U. Barnikol (1970):
The biochemistry of monoclonal immunoglobulins
A contribution to the antibody problem
13 th Intern. Congr. Haematol., Lehmanns,
München, 149 - 165

Hirschfeld, J. (1960):

Immunoelectrophoresis - procedure and
application to the study of group specific
variations in sera
Science Tools 7, 18 - 25

- (1961):

The use of immunoelectrophoresis in the
analysis of normal sera and in studies of
the inheritance of certain serum proteins
Science Tools 8, 17 - 25

- B. S. Blumberg und A. C. Allison (1964):

Relationship of human anti-lipoprotein
allotypic sera
Nature 202, 706 - 707

- L. Contu, Ch. Rittner und G. Geserick (1968):

Inheritance of the Ag(x) and Ag(y) antigens
Vox Sang. 14, 124 - 129

Ianelli, D., J. Hirschfeld und W. H. Stone (1966):

Variations in allotypic specificities of
cattle serum demonstrated by antisera
prepared in rabbits
Immunogenetics Ltr. 4, 117 - 120

Inman, J. K., und R. A. Reisfeld (1968):

Differences in amino acid composition of
papain Fd-fragments from rabbit γ -G-immuno-
globulins carrying different H-chain
allotypic specificities
Immunochemistry 5, 415 - 424

- Irwin, M. R., und R. W. Cumley (1942):
Immunogenetic studies of species: qualitative differences in the serum of backcross progeny following a generic cross in birds
Genetics 27, 228 - 237
- Janicka, W. (1972):
Studies on serum antigens in the domestic mink
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 133)
- Jensen, J. (1963):
Electrophoretic studies of normal bovine and guinea pig serum
Acta vet. scand. 4, 64 - 84
- Johansson, I., J. Rendel und H. O. Gravert (1966):
Haustiergenetik und Tierzüchtung
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- Kabat, E. A. und M. M. Mayer (1964):
Experimental immunochemistry
Charles C. Thomas, Publisher, Springfield,
2. Auflage
- Kaminski, M., und B. Ligouzat (1964):
Formation d'isoanticorps chez le canard
C. R. Acad. Sc. Paris 258, 2705 - 2706
- Karlson, P. (1966):
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage
- Kelus, A. S., und J. K. Moor-Jankowski (1961 a):
Serum antigens of hereditary character
Protides Biol. Fluids 2, 193 - 199

- Kelus, A. S., und J. K. Moor-Jankowski (1961 b):
An isoantigen (γB^A) of mouse γ -globulin
present in inbred strains
Nature 191, 1405 - 1406
- und P. G. H. Gell (1963):
Immunogenetics of rabbit γ -globulin
Genetics Today, Proc. XI th Int. Congr. of
Genetics, Den Haag
- - (1965):
An allotypic determinant specific to
rabbit macroglobulin
Nature 206, 313 - 314
- (1968):
Lp-1 allotypic determinant of rabbit
 β -lipoprotein
Nature 218, 595 - 596
- und B. Pernis (1971):
Allotypic markers of rabbit IgM
Eur. J. Immunol. 1, 123 - 132
- Kidd, K. K., und L. A. Sgaramella-Zonta (1972):
Further studies on the genetic relationships
of cattle breeds
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 13)
- Kimura, M., und T. Ohta (1971 a):
Polymorphism as a phase of molecular evolution
Nature 229, 467 - 469
- - (1971 b):
On the rate of molecular evolution
J. Molec. Evolution 1, 1 - 17

- Knight, K. L., und S. Dray (1968):
Identification and genetic control of two
rabbit α -2-macroglobulin allotypes
Biochemistry 7, 1165 - 1171
- L. Valenzuela und S. Dray (1969):
Allotypes and isozymes of rabbit
 α -1-arylesterase
Fed. Proc. 28, 435
- Koch, J., E. Scupin, G. Stranzinger und E. Mitscherlich
(1968):
Untersuchungen über Beziehungen zwischen
Blutgruppenfaktoren und Mastitisresistenz
beim schwarzbunten Niederungsrind
Z. Tierzücht. Züchtbiol. 85, 36 - 46
- Kohn, J. (1970):
Method for the detection and identification
of α -fetoprotein in serum
J. clin. Path. 23, 733 - 735
- Koshland, M. E., R. A. Reisfeld und S. Dray (1968):
Differences in amino acid composition
related to allotypic and antibody specificity
of rabbit IgG heavy chains
Immunochemistry 5, 471 - 483
- Kovácz, G., P. Soos und M. Nemesi (1970):
Breed structures and similarities in some
Hungarian cattle breeds examined by means
of the Tf, Hb and F-V gene-frequencies
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 159 - 162

- Kritchevsky, D., S. A. Tepper, P. Alaupovic und
R. H. Furman (1963):
Cholesterol content of human serum
lipoproteins obtained by dextran sulfate
precipitation and by preparative
ultracentrifugation
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 259 - 262
- Kubek, A. (1970):
persönliche Mitteilung
- Kunkel, H. G., M. Mannik und R. C. Williams (1963):
Individual antigenic specificity of
isolated antibodies
Science 140, 1218 - 1219
- Landsteiner, K. (1901):
Über Agglutinationserscheinungen normalen
menschlichen Blutes
Wien, klin. Wschr. 14, 1132 - 1134
- Landucci-Tosi, S., R. G. Mage und S. Dubiski (1970):
Distribution of allotypic specificities
A-1, A-2, A-14 and A-15 among immunoglobulin
G molecules
J. Immunol. 104, 641 - 647
- Lang, G. B. (1968):
Globulin allotyping in pigs using
isoprecipitins
Proc. XI th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Warschau, 301 - 306
- Latner, A. L., und A. W. Skillen (1968):
Isoenzymes in biology and medicine
Academic Press, New York, London

- Levy, R. J., D. W. Bilheimer und S. Eisenberg (1971):
Structure and metabolism of chylomicrons and
very low density lipoproteins (VLDL)
Biochemical Society Symposia 33, 3 - 17
Academic Press, New York, London
- Lewis, B. (1971):
Low density lipoproteins
Biochemical Society Symposia 33, 19 - 28
Academic Press, New York, London
- Li, C. C. (1955):
Population genetics
University Chicago Press, Chicago, London
- Lieberman, N., und S. Dray (1964):
Five allelic genes at the Asa locus which
control γ -globulin allotypic specificities
in mice
J. Immunol. 92, 584 - 594
- Mage, R. G., G. O. Young und R. A. Reisfeld (1968):
The association of the c-7 allotype of rabbit
with some light polypeptide chains which lack
b locus allotypy
J. Immunol. 101, 617 - 620
- Mancini, G., A. O. Carbonara, R. M. Tosi und A. L. Luzzati
(1969):
An immunogenetic study on the Ab-9 allotypic
specificity in the rabbit
Boll. Inst. Sieroter. Milano 48, 142 - 153
- Mandy, W. J., und C. W. Todd (1968):
Allotypy of rabbit immunoglobulin: an
agglutinating specificity
Vox Sang. 14, 264 - 270

- Mandy, W. J., und C. W. Todd (1970):
Rabbit immunoglobulin allotype A-12:
a new agglutinating specificity
Biochem. Genet. 4, 59 - 71
- Mc Dermid, E. M., E. Petrovský und H. Yamazaki (1969):
Isoantigens of serum proteins of the chicken
Immunology 17, 413 - 419
- Mc Devitt, H. O., und M. L. Tyan (1968):
Genetic control of the antibody response in
inbred mice
Transfer of response by spleen cells and
linkage to the major histocompatibility
(H-2)-locus
J. exp. Med. 128, 1 - 11
- Mc Kusick, V. A. (1971):
The mapping of human chromosomes
Sci. Amer. 224, 104 - 113
- Merryman, C., B. Frangione und E. C. Franklin (1967):
Peptide differences in purified mouse
antibodies
Immunochemistry 4, 31 - 36
- Millot, P. (1966 a):
Existence chez les bovins de groupes sériques
d'inhibition aux groupes Gm de l'homme
C. R. Acad. Sc. Paris 262, 1166 - 1168
- (1966 b):
Hetero- and isoantiglobulin agglutination
reactions in cattle
Proc. X th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Paris, 471 - 475

Millot, P. (1970):

The inhibition groups in the sera of cattle
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 121 - 124

Mitscherlich, E. (1965):

Genetische Beziehungen zwischen Eigenschaften
des Blutes und Leistungsmerkmalen bei
verschiedenen Haustierarten
Zkde. 37, 375 - 387

-

F. Hogreve, J. Koch und E. Scupin (1966):
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen
Mastitisresistenz und Blutgruppenfaktoren
beim schwarzbunten Niederungsrind
Dtsch. tierärztl. Wschr. 73, 97 - 102

Narayan, K. A., und F. A. Kummerow (1966):

A comparison of dyes used for staining
electrophoretically separated lipoprotein
components
Clin. Chim. Acta 13, 532 - 535

Neilands, J. B. (1952):

Studies on lactic dehydrogenase of heart
J. Biol. Chem. 199, 373 - 381

Neimann-Sörensen, A., und A. Robertson (1961):

The association between blood groups and
several production characteristics in three
Danish cattle breeds
Acta Agric. Scand. 11, 163 - 196

Nielsen, P. B. (1972):

Isoantigens of the immunoglobulins in pigs
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 17)

- Ohta, T., und M. Kimura (1971):
On the constancy of the evolutionary rate
of cistrons
J. Molec. Evolution. 1, 18 - 25
- Oss, C. J. van (1967):
Methods used in the characterization of
immunoglobulins
in: T. J. Greenwalt (Hrsgb.):
Advances in Immunogenetics, J. B. Lippincott
Comp., Philadelphia, Toronto
- Osterhoff, D. R. (1966):
Blood group gene-frequencies in South African
cattle breeds
Proc. X th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Paris, 107 - 114
- Ouchterlony, Ö. (1958):
Diffusion-in-gel methods for immunological
analysis
Progr. Allergy 5, 1 - 77
- (1962):
Diffusion-in-gel methods for immunological
analysis II
Progr. Allergy 6, 30 - 107
- (1968):
Handbook of immunodiffusion and
immunoelectrophoresis
Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor
- Oudin, J. (1956 a):
Réaction de précipitation spécifique entre
des sérums d'animaux de même espèce
C. R. Acad. Sc. Paris 242, 2489 - 2490

- Oudin, J. (1956 b):
L'"allotypie" de certains antigènes
protéidiques du sérum
C. R. Acad. Sc. Paris 242, 2606
- und M. Michel (1963):
Une nouvelle forme d'allotypie des globulines
gamma du sérum de lapin apparemment liée à
la fonction et à la spécificité anticorps
C. R. Acad. Sc. Paris 257, 805 - 808
- (1966 a):
The genetic control of immunoglobulin synthesis
Proc. Roy. Soc. (Lond.) Ser. B 166, 207 - 219
- (1966 b):
Genetic regulation of immunoglobulin synthesis
J. Cell. Physiol. 67, Suppl. 1, 77 - 108
- Pernis, B., G. Chiappino, A. S. Kelus und P. G. H. Gell
(1965):
Cellular localization of immunoglobulins with
different allotypic specificities in rabbit
lymphoid tissues
J. exp. Med. 122, 853 - 876
- G. Torrigiani, L. Amante, A. S. Kelus und
J. J. Cebra (1968):
Identical markers of heavy polypeptide chains
present in different immunoglobulin classes
Immunology 14, 445 - 451
- Pirchner, F., H. Rohrbacher, H. Leithe, S. Chakrabarti
und W. Schleger (1972):
Heterozygosity and cattle fertility
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 14)

Porter, R. R. (1967):

The structure of antibodies
Sci. Amer. 217, 81 - 90

Poulik, M. D. (1959):

Starch-gel-immunoelectrophoresis
J. Immunol. 82, 502 - 515

Rapacz, J., und J. Hasler (1968):

Allotypes (serum antigens) in farm animals
Proc. XI th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Warschau, 101 - 105

- N. Korda und W. H. Stone (1968):
Serum antigens of cattle
I. Immunogenetics of a macroglobulin allotype
Genetics 58, 387 - 398
- R. H. Grummer, J. Hasler und R. M. Shackelford
(1970 a):
Allotype polymorphism of low density
 β -lipoproteins in pig serum (LDLp-1,
LDLp-2)
Nature 225, 941 - 942
- J. Hasler, M. Duniec und J. Kazana (1970 b):
Serum antigen of β -lipoprotein in pigs
(LDLp-3)
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 383 - 385
- J. Wegrzyn, M. Duniec und J. Hasler (1970 c):
Immunoglobulin antigen Ic-1 in cattle
XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, (Abstracta
S. 128)

- Rapacz, J., J. Hasler und A. L. Pope (1970 d):
Lipoprotein serum antigen in sheep (Lps-1)
XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest (Abstracta S. 11)
- J. Hasler, A. Kazana und M. Duniec (1970 e):
Isoprecipitins against serum antigens in
normal sera of swine
Proc. XII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Budapest, 323 - 325
- (1972):
persönliche Mitteilung
- und J. Hasler-Rapacz (1972):
 γ -1-globulin (IgG-1) allotype C-1 in cattle
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 117)
- J. Hasler-Rapacz, R. H. Grummer und
R. M. Shackelford (1972 a):
A low density β -lipoprotein allotype system
(Lpp) in swine
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 125)
- D. Li, W. H. Stone und J. Hasler-Rapacz
(1972 b):
Transmission and development of acquired and
autogenous γ -2-globulins in cattle
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 120)
- J. Hasler-Rapacz, A. L. Pope und
R. Antoniewicz (1972 c):
Immunogenetic studies on two serum antigens
(allotypes) in sheep
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 122)

- Rapacz, J., I. Wiatroszak und J. Hasler-Rapacz (1972 d):
Isoprecipitins in immune anti pig-blood sera
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 12)
- Rasmusen, B. A. (1965):
Isoantigens of γ -globulin in pigs
Science 148, 1742 - 1743
- Reisfeld, R. A., S. Dray und A. Nisonoff (1965):
Differences in amino acid composition of
rabbit γ -G-immunoglobulin light polypeptide
chains controlled by allelic genes
Immunochemistry 2, 155 - 167
- Rendel, J. (1961):
Recent studies on relationship between blood
groups and production characters in farm
animals
Z. Tierzücht. Züchtbiol. 75, 97 - 109
- Ressler, N., R. Springgate und J. Kaufman (1961):
A method of lipoprotein electrophoresis
J. Chromatogr. 6, 409 - 415
- Rieder, R. F., und J. Oudin (1963):
Studies on the relationship of allotypic
specificities to antibody specificities in
the rabbit
J. exp. Med. 118, 627 - 633
- Rittner, Ch. (1970):
Die Lipoprotein-(LDL)-Polymorphismen des
menschlichen Serums
Habilitationsschrift, Bonn

- Roelcke, D. (1968):
Immunelektrophoretisch demonstrierbare
Varianten des alpha-2 HS-Glykoproteins
Spontane Modifikationen und ihre
Induzierbarkeit
Z. ges. exp. Med. 148, 242 - 254
- Scheidegger, J. J. (1955):
Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse
Int. Arch. Allergy 7, 103 - 110
- Schütze, A. (1902):
Über weitere Anwendung der Präzipitine
Dtsch. med. Wschr. 28, 804 - 806
- Sell, S. (1966):
Immunoglobulin M allotypes of the rabbits:
identification of a second specificity
Science 153, 641 - 643
- (1967):
Isolation and characterisation of rabbit
colostral IgA
Immunochemistry 4, 49 - 55
- Singh, C. S. P. (1972):
Die Verteilung der Blutgruppen, Serum-
transferrine und Postalbumine in der
österreichischen Fleckviehzucht und deren
Beziehungen zu Leistungs- und Formmerkmalen
Inaug. Diss., Göttingen
- Skalba, D. (1964):
Allotypes of hen serum proteins
Nature 204, 894

- Skalba, D. (1966):
Antigenic differences of hen serum proteins
detected by anti-allotypic immune-sera
Proc. X th Europ. Conf. Anim. Blood Groups,
Paris, 477 - 480
- Skiba, E. (1972):
Preliminary studies on allotypes in sheep
XIII th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Wien, (Abstracta S. 121)
- Small, P. A., R. A. Reisfeld und S. Dray (1965):
Peptide differences of rabbit γ -G-immuno-
globulin light chains controlled by allelic
genes
J. molec. Biol. 11, 713 - 721
- - - (1966):
Peptide maps of rabbit γ -G-immunoglobulin
heavy chains controlled by allelic genes
J. molec. Biol. 16, 328 - 333
- Smith, G. P., L. Hood und W. M. Fitch (1971):
Antibody diversity
Ann. Rev. Biochem. 40, 969 - 1012
- Smithies, O. (1955):
Zone electrophoresis in starch gels: group
variations in the serum of normal human adults
Biochem. J. 61, 629 - 641
- (1959):
Zone electrophoresis in starch gels and its
application to studies of serum proteins
Adv. Prot. Chem. 14, 65 - 113

- Spooner, R. L. (1968):
Studies on IgG allotypes in cattle
Proc. XI th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Warschau, 195 - 199
- Spring, S. B., A. Nisonoff und S. Dray (1970):
Independence of allotypic determinants and
antibody specificity
J. Immunol. 105, 653 - 660
- Steffen, C. (1968):
Allgemeine und experimentelle Immunologie
und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Stemke, G. W. (1964):
Allotypic specificities of A- and B-chains
of rabbit γ -globulin
Science 145, 403 - 405
- (1971):
Rabbit immunoglobulin allotypy: the
physicochemical nature of a-group determinants
Can. J. Biochem. 49, 1257 - 1263
- Tikhonov, V. N., S. M. Valdman und M. A. Savina (1968):
Immunogenetic study of allotypes of pig
serum proteins using isoprecipitins
Proc. XI th Europ. Conf. Anim. Blood Groups
Biochem. Polymorph., Warschau, 307 - 309
- Todd, C. W. (1963):
Allotypy in rabbit 19 S proteins
Biochem. Biophys. Res. Comm. 11, 170 - 175
- Tria, E., und A. M. Scanu (1969):
Structural and functional aspects of
lipoproteins in living systems
Academic Press, London, New York

- Valentine, R. C., und N. M. Greene (1967):
Electron microscopy of an antibody-hapten-complex
J. molec. Biol. 27, 615 - 617
- Wallis, C., und J. L. Melnick (1971):
Enhanced detection of Australia antigen in serum hepatitis patients by discontinuous counter-immunoelectrophoresis
Appl. Microbiol. 21, 867 - 869
- Watson, J. D. (1970):
Molecular biology of the gene
W. A. Benjamin, Inc., New York, 2. Auflage
- Weber, E. (1967):
Grundriß der biologischen Statistik
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 6. Auflage
- Weiler, E., und I. J. Weiler (1968):
Unequal association of mouse allotypes with antibodies of different specificities
Studies with a plaque assay procedure employing poly-D- and poly-L-alanine as haptens
J. Immunol. 101, 1044 - 1057
- Wistar, R. (1969):
Immunoglobulin allotype in the rat
Localization of a specificity to the light chain
Immunology 17, 23 - 32

- Wittmann, G. (1970):
Die Verwendung von Diäthylaminoäthyl-Dextran
(DEAE-D) als Adjuvans bei der Immunisierung
von Meerschweinchen mit inaktiviertem Maul-
und Klauenseuche (MKS)-Virus
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 213, 1 - 8
- Wolf, B., C. A. Janeway, R. R. A. Coombs, D. Catty,
P. G. H. Gell und A. S. Kelus (1971):
Immunoglobulin determinants on the lymphocytes
of normal rabbits
III. As-4 and As-6 determinants on individual
lymphocytes and the concept of allelic
exclusion
Immunology 20, 931 - 944
- World Health Organization (1964):
Nomenclature for human immunoglobulins
Bull. W.H.O. 30, 447 - 449
- Wright, S. (1921):
Evolution in Mendelian populations
Genetics 6, 111 - 178
- Würzburg, U. (1971):
Beziehungen zwischen Immunantwort und
Histokompatibilitäts-Allelen bei Inzucht-
Rattenstämmen
3. Tagung Ges. f. Immunol., Marburg/Lahn,
(Abstracta S. 82)
- Wunderlich, J., und L. A. Herzenberg (1963):
Genetics of a γ -globulin isoantigen
(allotype) in the mouse
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 49, 592 - 598

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Mitscherlich sage ich meinen herzlichen Dank für die Aufnahme an seinem Institut und die hilfreiche Förderung, die ich dort erfahren habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr bedanke ich mich für seine freundlichen Bemühungen um diese Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Geldermann für seine unermüdliche Hilfe, seine Hinweise und Ratschläge.

Bei Herrn Dipl.-Biol. A. Rada^ſ, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Göttingen, bedanke ich mich für die Isolierung der Lipoproteine.

Allen Mitarbeitern des Tierärztlichen Instituts, die mich bei meiner Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben, besonders Herrn Dr. J. Koch, Frau R. Brzoska und Frl. U. Wens, danke ich für ihre liebenswürdige Hilfe. Gleiches gilt für Herrn Univ.-Doz. Dr. D. O. Schmid, Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung, Tierzuchtforschung e. V., München.

Die Tiere zur Gewinnung der Isoimmunseren wurden mir dankenswerterweise vom Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

LEBENS LAUF

Am 24. Januar 1946 wurde ich als Sohn des Bankbeamten Josef Heeg und seiner Ehefrau Martha, geb. Piltz, in München geboren.

Von 1952 bis 1956 besuchte ich die Volksschule in München. 1956 trat ich in die Gisela-Oberrealschule in München ein, an der ich 1965 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1965 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Studium der Tiermedizin. Am 19. Oktober 1970 bestand ich dort die tierärztliche Prüfung und am 30. Dezember 1970 wurde mir die Bestallung als Tierarzt erteilt.

Seit November 1970 bin ich am Tierärztlichen Institut der Georg-August-Universität Göttingen als wissenschaftlicher Mitarbeiter mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

